

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO MUTANTE
TERMOSENSIBLE DE LA RNASA E EN EL METABOLISMO
DEL RNA DE *ESCHERICHIA COLI***

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

José Antonio Reyes Darías

Bajo la dirección de la doctora

Sidney R. Kushner

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

TESIS DOCTORAL

**Caracterización de un nuevo mutante termosensible de la
RNasa E en el metabolismo del RNA de *Escherichia coli*.**

Memoria científica presentada por JOSÉ ANTONIO REYES DARIAS, licenciado en Biología Molecular y Celular por la Universidad de La Laguna de S/C de Tenerife, para optar al grado de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad Complutense de Madrid.

José Antonio Reyes Darías.

Madrid, 2012



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID



The University of Georgia®

El trabajo descrito en la presente memoria ha sido realizado por José Antonio Reyes Darias, bajo la dirección del profesor Sidney R. Kushner, del Departamento de Genética Molecular, Davison Life Sciences Building, University of Georgia, Athens, Georgia (USA) y tutelado por la Profesora Titular Dolores Aragonés Sanz, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad Complutense de Madrid.

En Madrid a 20 de Marzo de 2012

Opta al grado de Doctor

V° B° Director de la tesis

V° B° Tutora de la tesis

Fdo. José Antonio Reyes Darias.

Fdo. Professor Sidney R. Kushner

Fdo. Dra. Dolores Aragonés Sanz.

Todo el trabajo descrito en esta memoria ha sido realizado en el laboratorio del Profesor Sidney Ralph Kushner, del departamento de Genética Molecular, Davison Life Sciences Building, University of Georgia, Athens, Georgia (USA), gracias a la financiación concedida al profesor Sidney R. Kushner, para el proyecto GM57220 del National Institute of Health (NIH) y a las becas de ampliación de estudios para postgraduados de la Fundación Canaria Dr. Manuel Morales y de Formación en Investigación (BEFI) del Ministerio de Sanidad y consumo-Instituto de Salud Carlos III, que me han sido concedidas para la realización de la presente Tesis Doctoral.

Declaración de Originalidad.

El contenido de esta tesis es completamente original y, hasta donde llega mi conocimiento, no ha sido anteriormente escrito o publicado por ninguna otra persona. Este material no ha sido previamente presentado para la obtención de un grado o diploma en ninguna otra Universidad.

Fdo. José Antonio Reyes Darías

Cubierta anterior y posterior: Fotografías de microscopía óptica de fluorescencia mediante tinción con DAPI de los mutantes de E.coli *rne-204* a 44°C (anterior) y *rne645/204* a 44°C (posterior).

Agradecimientos

Durante mi etapa de doctorando he ido conociendo a magníficas personas que han contribuido directa o indirectamente a la realización de esta tesis y a las que me gustaría agradecerle toda su ayuda, apoyo moral y sobre todo su amistad.

Las primeras personas que vienen a mi mente a la hora de agradecer su ayuda son mis progenitores: José M^a y Carmen, los mejores padres del mundo, por estar siempre presentes cuando más los necesitaba, por sus ánimos y por tener una fe ciega en mí. Sin ellos, nunca hubiera realizado esta tesis, un trillón de gracias papá y mamá.

Una vez, el historiador estadounidense Henry Brooks Adams (1838-1918) dijo: *“Un profesor impresiona para la eternidad y nunca logra saber dónde termina su influencia”*. Esta frase refleja muy bien mi admiración por mi profesor Sidney Ralph Kushner. Yo tuve la increíble suerte de tropezarme en los caprichosos caminos de la ciencia con la excelente persona, amigo y profesor Sidney R. Kushner, al cual siempre le estaré agradecido por la gran oportunidad que me brindó para realizar el doctorado en su laboratorio del departamento de Genética de la Universidad de Georgia (USA). Su inestimable ayuda y sabios consejos, que me brindó durante la realización de mi tesis nunca los podré olvidar. También quiero agradecer a mis queridos compañeros y amigos de laboratorio Hili Degani, Daewan Chung, Nikii Dubose, Bijoy Mohanty, Val Maples, Tariq Perwez, Jorn Lakowski, Marcus Beck y a todos aquellos que compartieron, por algún tiempo, mi presencia en el laboratorio, por su ayuda y sugerencias experimentales, muchas de las cuales contribuyeron a este trabajo.

Me gustaría agradecer especialmente a la cansona de Carito su apoyo, consejos, cariño y su ayuda incondicional en todo momento, también al Dr. Fabián y a la futura doctora Celeste su colaboración, paciencia y tiempo que me han dedicado en la tramitación de la presente tesis. También quiero agradecer al Dr. Carlos Flores su ayuda y consejos. A mi amigo el Dr. Felix Claverie por creer en mí y animarme a cruzar el océano Atlántico y trabajar en USA. A mi tutora la Dra. M^a Dolores Aragonés por su atención y colaboración en todo momento.

No me puedo olvidar de todos mis queridos amigos del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra de Granada: Rosa, Belén, Raquel, Mariascen, Kiko, Soledad, Estévez, Luis, Antonio Barquilla, Patxi, Antonio Cavazzuti, Paco, José Manuel, Migué y a

todos aquellos que me olvido de nombrar por sus insistencias, ánimos y ayuda para escribir esta tesis.

Tampoco puedo olvidarme de mi jefe actual el Dr. Tino Krell, por su empeño estresante en que defendiera esta tesis...¡¡¡muchas gracias Tino!!!!. Además, quiero agradecer a mis actúales compañeros Miriam, Hortensia, Cristina, Saray, Andrés y muchos más por sus ánimos para poner punto final a esta memoria.

Por último me gustaría gradecer a La Fundación Canaria Manuel Morales de La Palma y al Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Sanidad y Consumo por haberme concedido las becas para poder realizar mi tesis doctoral en USA.

“En ningún lugar se encuentra la naturaleza en su totalidad tanto como en sus más pequeñas criaturas”

Plinio el Viejo (23-79 d.C.)

Dedico esta tesis a mis padres por el sacrificio, entrega y amor que siempre me han regalado.

ÍNDICE

i) Lista de figuras y tablas

ii) Lista de abreviaturas

Resumen	1
Introducción	5
1. Importancia del estudio de la degradación del RNA en <i>Escherichia coli</i>.	5
1.1 <i>Escherichia coli</i> : organismo modelo para el estudio de procesos biológicos básicos.	5
1.2 Importancia biológica y biotecnológica del estudio de la degradación del RNA en <i>E. coli</i> .	8
2. Composición, estructura y síntesis del RNA bacteriano.	10
2.1 Composición y estructura del RNA.	10
2.2 Síntesis del RNA en <i>E. coli</i> .	12
2.3 Clases de moléculas de RNA en <i>E. coli</i> .	15
2.3.1 rRNA.	15
2.3.2 tRNA.	17
2.3.3 mRNA.	19
2.3.4 sRNA.	20
3. Procesamiento del RNA en <i>E.coli</i>.	23
3.1 Procesamiento de RNA ribosomal.	23
3.2 Procesamiento del tRNA.	27
3.3 Procesamiento del mRNA.	30
4. Degradación de RNA en <i>E. coli</i>.	30
4.1 Factores implicados en la degradación del RNA.	30
4.1.1 Determinantes estructurales de la estabilidad e inestabilidad del mRNA.	32
4.1.2 Enzimas implicadas en la degradación y procesamiento del RNA en <i>E. coli</i> .	34
4.1.2.1 Exorribonucleasas.	35
4.1.2.1.1 PNPasa.	36
4.1.2.1.2 RNasa II.	38
4.1.2.1.3 RNasa R.	38
4.1.2.1.4 Oligorribonucleasa.	38
4.1.2.2 Endorribonucleasas	39
4.1.2.2.1 RNasa Z.	40
4.1.2.2.2 RNasa III.	41

4.1.2.2.3 RNasa G.	42
4.1.2.2.4 RNasa E.	45
4.1.2.2.4.1 Organización del dominio funcional catalítico de la RNasa E.	47
4.1.2.2.4.2 Dominio C-terminal.	47
4.1.2.2.4.3 Degradosoma.	48
4.1.2.2.4.4 Efecto del extremo 5' de los RNA en la actividad de la RNasa E.	50
4.1.2.2.4.5 Activación catalítica.	52
4.1.2.2.4.6 Especificidad del sitio de corte de la RNasa E.	53
4.1.2.2.4.7 La regulación de la síntesis de la RNasa E.	54
4.1.2.2.4.8 Actividad RNasa E en células humanas.	56
4.1.2.2.4.9 Moduladores de la actividad de la RNasa E.	57
4.1.2.2.4.9.1 Inhibidores de la RNasa E.	57
4.1.2.2.4.9.2 Reclutamiento de la RNasa E por Hfq y sRNA.	58
4.1.2.2.4.10 Otras proteínas implicadas en la degradación de mRNA.	60
4.1.2.2.4.10.1 RNA helicasa RhlB.	60
4.1.2.2.4.10.2 Poly(A) polimerasa (PAP I).	61
4.1.2.2.4.10.3 Proteínas de unión a poly(A): S1 y CspE.	62
4.1.2.2.4.10.4 Enolasa.	63
4.2 Rutas de degradación del mRNA en <i>E.coli</i> .	64
4.2.1 Degradación del mRNA en <i>E. coli</i> en condiciones normales de crecimiento.	64
4.2.2 Degradación del mRNA en condiciones de stress.	65
5. RNase E implicada en la división celular.	66

Objetivos **71**

Materiales y métodos **75**

2.1 Materiales.	75
2.1.1 Reactivos químicos.	75
2.2.2 Isótopos radiactivos.	75
2.1.3 Cepas bacterianas.	75
2.3 Medios de cultivo.	78
2.3.1 Medios líquidos.	78
2.3.2 Medios de crecimiento sólidos.	80
2.3.3 Suplementos nutricionales.	81
2.3.4 Antibióticos.	82

2.2 Métodos.	83
2.2.1 Conservación de las cepas bacterianas mediante criocongelación.	83
2.2.2 Curvas de crecimiento a 37°C y 44°C.	84
2.2.3 Métodos de purificación y análisis de ácidos nucleicos.	85
2.2.3.1 Aislamiento DNA plásmidico mediante mini-preparación.	85
2.2.3.2 Digestión de DNA con enzimas de restricción.	85
2.2.3.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.	85
2.2.3.4 Extracción y purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa.	86
2.2.3.5 Ligación de fragmentos de DNA.	86
2.2.3.6 Secuenciación de DNA.	87
2.2.3.6.1 Secuenciación automática.	87
2.2.3.6.2 Secuenciación en geles desnaturalizantes de urea-poliacrilamida.	87
2.2.3.7 Extracción de RNA.	88
2.2.3.8 Análisis Northern Blot del procesamiento de tRNA y rRNA.	89
2.2.4 Transformación en células competentes.	90
2.2.4.1 Preparación de células competente Método RbCl (método Kushner)	90
2.2.4.2 Preparación de células electrocompetentes.	90
2.2.4.3 Transformación.	91
2.2.4.4 Electroporación.	91
2.2.5 Mutagénesis.	92
2.2.5.1 Mutagénesis aleatoria <i>in vitro</i> del plásmido pJRK1.	92
2.2.5.2 Aislamiento de mutantes termosensibles.	92
2.2.5.3 Replicación en placa.	93
2.2.6 Marcaje de sondas de DNA.	93
2.2.6.1 Marcaje radiactivo de oligonucleótidos en su extremo 5'.	93
2.2.6.2 Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA.	94
2.2.7 Extracción de Proteínas.	94
2.2.7.1 Análisis de la expresión de la RNasa E mediante Western Blot.	95
2.2.8 Técnicas de microscopía.	96
2.2.8.1 Microscopía de contraste de fase.	96
2.2.8.2 Microscopía de fluorescencia con DAPI.	96
2.2.9 Análisis bioinformático de la región N-terminal.	97
2.2.10 Construcción de plásmidos.	97
2.2.10.1 pUG21: RneΔ645 etiquetada con una poli-his.	97
2.2.10.2 pJRK1: RneΔ645.	99

Resultados	103
3.1 Construcción de un mutante de <i>E. coli</i> por delección del gen cromosómico <i>rne</i> .	103
3.2 Introducción de mutaciones aleatorias en la región codificante del dominio catalítico de la RNasa E y selección de mutantes termosensibles.	106
3.3 La mutación 204 Pro→Leu confiere termosensibilidad a la RNasa E de longitud completa.	108
3.4 Generación del alelo mutante <i>rne</i> Δ645/204 con el promotor nativo de <i>rne</i> .	109
3.5 Selección de un alelo supresor del mutante <i>rne</i> -204.	110
3.6 Análisis estructural de la región-terminal de la RNasa E.	111
3.7 Propiedades de crecimiento de los mutantes termosensibles de la RNasa E.	113
3.8 Los alelos mutantes <i>rne</i> -204 y <i>rne</i> Δ645/204 son inviables a 44°C.	119
3.9 Procesamiento del 9S rRNA en los mutantes.	121
3.10 El procesamiento <i>in vivo</i> del 5SrRNA es defectuoso en el mutante <i>rne</i> Δ645/204 y no es dependiente del degradosoma.	121
3.11 El procesamiento <i>in vivo</i> del 5SrRNA es defectuoso en el mutante <i>rne</i> -204 y restablecido en doble mutante revertante <i>rne</i> -204/203.	122
3.12 Análisis del Procesamiento de t-RNA en los mutantes de la RNasa E.	124
3.13 Análisis de la regulación de la síntesis de la RNasa E en los mutantes <i>rne</i> -204 y <i>rne</i> Δ645/204.	131
3.14 El alelo <i>rne</i> Δ645/204 no es autorregulado.	131
3.15 La autorregulación es alterada en el mutante <i>rne</i> -204 y restaurada en el doble mutante revertante a 44°C.	136
3.16 Análisis de la degradación de mRNA en los mutantes <i>rne</i> -204 y <i>rne</i> Δ645/204.	138
3.16.1 Degradación del mRNA <i>trxA</i> .	139
3.16.2 Degradación de mRNA <i>cspE</i> .	140
3.16.3 Degradación de mRNA <i>Lp</i> .	141
3.16.4 Degradación de mRNA <i>rpsO</i> .	142
3.16.5 Degradación de mRNA <i>ompA</i> .	143
3.16.6 Degradación de mRNA <i>rpsT</i> .	144
3.17 Implicación de la RNasa E en la morfología y división celular.	146
3.18 Los mutantes <i>rne</i> -204 y <i>rne</i> Δ645/204 presentan una disminución de los niveles de expresión de las proteínas FtsA y FtsZ.	146

3.19 La estabilidad de los transcritos policistrónicos <i>ftsQAZ</i> y <i>ftsAZ</i> aumentan en el mutante <i>rne-204</i> .	150
3.20 Los mutantes <i>rne-204</i> y <i>rneΔ645/204</i> presentan una morfología celular filamentosa.	152
3.21 Variaciones del ratio FtsZ/FtsA parecen no ser responsables del fenotipo celular filamentoso.	158
Discusión	163
5.1 Identificación de un nuevo mutante termosensible de la RNasa E.	163
5.2 El mutante termosensible <i>rne-204</i> de <i>E. coli</i> es un nuevo modelo de estudio de la actividad de la RNasa E <i>in vivo</i> .	165
5.3 El degradosoma está implicado en la autorregulación y degradación del mRNA.	166
5.4 Implicación de la RNasa E en la división celular.	168
5.5 Implicación de la RNasa E en la morfología.	170
5.6 ¿Cuál es la función celular esencial de la RNasa E?	173
Conclusiones	179
Bibliografía	182

Resumen

La endorribonucleasa E (RNasa E) de *Escherichia coli*, fue inicialmente descubierta como una enzima implicada en la maduración del RNA ribosómico (rRNA) 5S. Posteriormente, se demostró el papel multifuncional de la RNasa E en diferentes aspectos del metabolismo del RNA de *E. coli*, incluyendo la degradación de la mayoría de los RNA mensajeros (mRNAs), procesamiento de los extremos 3' de los RNA transferentes (tRNAs), maduración del rRNA 16S, procesamiento y/o degradación de RNA reguladores pequeños (sRNAs), procesamiento de la subunidad de RNA (M1 RNA) de la RNasa P y control de la replicación de los plásmidos tipo ColE1 mediante la degradación de un RNA antisentido represor de la replicación denominado RNAI. Además de su importante papel en el metabolismo del RNA, se ha sugerido que la RNasa E forma parte del citoesqueleto de *E. coli*. La inactivación de esta enzima resulta en la producción de una morfología celular filamentosa e incapacidad para formar colonias en medio sólido. La acción de la RNasa E es esencial para la viabilidad de *E. coli*, y está conservada en la mayoría de las bacterias Gram negativas y en un número limitado de Gram positivas, lo cual la convierte en una potencial diana terapéutica. La RNasa E presenta un dominio N-terminal donde reside la actividad catalítica, una región central rica en argininas implicada en la unión al RNA (ARRBS) y una región C-terminal que sirve como plataforma de anclaje para otras proteínas implicadas en la degradación de mRNA, formando un complejo multiproteico denominado degradosoma. Sin embargo, solamente la región N-terminal de la RNasa E es necesaria para mantener la viabilidad celular, y es la región de la proteína más conservada durante la evolución. El análisis de los dos únicos mutantes termosensibles de la RNasa E de *E. coli* (*rne-1* y *rne-3071*), caracterizados hasta hoy, han contribuido enormemente al conocimiento de la función de la RNasa E en *E. coli*. A pesar de los importantes progresos realizados en la determinación de la importancia funcional de la RNasa E en el metabolismo del RNA y la resolución de la estructura cristalina del dominio N-terminal catalítico, existe un limitado conocimiento de los residuos de aminoácidos y subdominios funcionales de la RNasa E implicados en la unión al sustrato, la especificidad de corte y su dependencia por el extremo 5' monofosforilado del sustrato.

La presente memoria de tesis describe el aislamiento y la caracterización *in vivo* de un nuevo mutante termosensible de la RNasa E, que presenta la sustitución de un aminoácido (Pro→Leu) en la posición 204 de la secuencia de aminoácidos de la RNasa E. El análisis de este mutante fue realizado tanto en su forma completa, *rne-204*, como en una forma truncada, *rneΔ645/204*, la cual contiene los primeros 417 aminoácidos del dominio catalítico N-terminal, pero carece de la región ARRBS y de la región de andamiaje del degradosoma. Esta mutación está localizada en el dominio N-terminal y dentro del subdominio denominado 5'sensor, el cual está implicado en el reconocimiento de los extremos 5' de los sustratos de RNA de la RNasa E. Analizamos el efecto *in vivo* de dicha mutación sobre la tasa de crecimiento, la viabilidad celular, el procesamiento del 5S rRNA, la maduración de distintos tRNAs, así como las vidas medias de diversos mRNAs y la regulación de la propia RNasa E. Por otro lado, se examinó en estos mutantes el efecto en los niveles de expresión de los genes, *ftsZ* y *ftsA*, esenciales para la correcta división celular y cuyos transcritos primarios son procesados por la RNasa E, así como la morfología celular de estos mutantes en condiciones de temperatura permisiva y no permisiva. Los resultados obtenidos del estudio de estos mutantes demuestran que el subdominio 5' sensor es importante para la actividad catalítica de la RNasa E y que la región C-terminal de andamiaje del degradosoma no es esencial, pero si necesaria para una eficiente degradación y procesamiento del RNA. Además, estos mutantes presentan un crecimiento dependiente de la temperatura acompañado de un defecto general del metabolismo del RNA y una pérdida de la autorregulación de la RNasa E. Sorprendentemente, el análisis microscópico de los mutantes reveló una relación entre el bloqueo de la citocinesis y la inactividad de la RNasa E.

Figura 1.1	<i>E. coli</i> y Theodor von Escherich.
Figura 1.2	Ribonucleótido y bases nitrogenadas del RNA.
Figura 1.3	Estructura secundaria tipo tallo-lazo del RNA.
Figura 1.4	Terminadores Rho-independiente.
Figura 1.5	Organización de los operones ribosómicos de <i>E. coli</i> .
Figura 1.6	Estructura terciaria y secundaria del tRNA.
Figura 1.7	Representación de un mRNA procariota monocistrónico.
Figura 1.8	Esquemática representación del procesamiento operon <i>rrnB</i> .
Figura 1.9	Procesamiento del 9S rRNA y maduración del 5S rRNA.
Figura 1.10	Procesamiento de tRNAs en <i>E. coli</i> .
Figura 1.11	Degradación de mRNA en <i>E. coli</i> .
Figura 1.12	Acción catalítica de la exorribonucleasas.
Figura 1.13	Estructural composición del dominio catalítico de la RNasa E.
Figura 1.14	Interacción del grupo 5' fosfato con el subdominio 5' sensor.
Figura 1.15	Estructura de la región 5'UTR del transcrito de la RNasa E.
Figura 1.16	Degradación de mRNA mediante complejos RNasa E-Hfq-sRNA.
Figura 1.17	Modelo para la contribución de los promotores <i>ftsQAZ</i> para la expresión de <i>ftsZ</i> .
Figura 2.1	Plásmido pUG21
Figura 3.1	Representación esquemática de la construcción del alelo <i>rneΔ1018::bla</i> .
Figura 3.2	Localización de las mutaciones termosensibles.
Figura 3.3	Estructura estimada tipo barril TIM de la región 147-392 de la RNasa E.
Figura 3.4	Curvas de crecimiento a 37°C (A) y 44°C (B) de las cepas llevado los alelos <i>rne⁺</i> , <i>rne-1</i> , <i>rne-204</i> y <i>rne-204/203</i> en plásmidos de 6-8 copias por célula
Figura 3.5	Análisis de las propiedades de crecimiento y unidades formadoras de colonias de los mutantes termosensibles <i>rne204</i> y <i>rneΔ645/204</i> a 44°C.

Figura 3.6	Procesamiento <i>in vivo</i> del 9S rRNA de varios mutantes truncados de la RNasa E.
Figura 3.7	Procesamiento <i>in vivo</i> del 9S rRNA de varios mutante de la RNasa E.
Figura 3.8	Análisis de la maduración de los tRNA ^{Pro} y tRNA ^{Asn} en varios mutantes de la RNasa E.
Figura 3.9	Análisis de la maduración de los tRNA ^{Cys} y tRNA ^{His} en varios mutantes de la RNasa E.
Figura 3.10	Análisis de la maduración de los tRNA ^{Pro} y tRNA ^{Asn} en varios mutantes de la RNasa E.
Figura 3.11	Análisis de la maduración de los tRNA ^{Cys} y tRNA ^{His} en varios mutantes de la RNasa E.
Figura 3.12	Análisis de los niveles intracelulares de la RNasa E en varias cepas mediante western blot.
Figura 3.13	Análisis de los niveles intracelulares de la RNasa E en varias cepas mediante western blot.
Figura 3.14	Análisis del nivel de mRNA <i>rne</i> de las diferentes RNasa E mutantes.
Figura 3.15	Análisis de los niveles intracelulares de la RNasa E en varias cepas mediante western blot.
Figura 3.16	Análisis de los niveles intracelulares de la RNasa E en varias cepas mediante western blot.
Figura 3.17	Perfil de degradación del mRNA de <i>trxA</i> .
Figura 3.18	Perfil de degradación del mRNA de <i>cspE</i> .
Figura 3.19	Perfil de degradación del mRNA de <i>lpp</i> .
Figura 3.20	Perfil de degradación del mRNA de <i>rpsO</i> .
Figura 3.21	Perfil de degradación del mRNA de <i>ompA</i> .
Figura 3.22	Perfil de degradación del mRNA de <i>rpsT</i> .
Figura 3.23	Comparación de los niveles de las proteínas de FtsZ y FtsA..
Figura 3.24	Comparación de los niveles de las proteínas de FtsZ y FtsA.
Figura 3.25	Efecto de la mutación <i>rne-204</i> en la degradación del of <i>ftsZ mRNA</i> .
Figura 3.26	Fenotipo morfológico y distribución de los nucleoides de los diferentes mutantes a 37°C.
Figura 3.27	Fenotipo morfológico y distribución de los nucleoides de los diferente mutantes a 44°C
Figura 3.28	Detalle de la morfología celular y distribución de los nucleoides teñidos con DAPI

Figura 3.29 Detalle de la morfología celular y distribución de los nucleoides teñidos con DAPI del mutante *rne645/204* a 44°

Figura 3.30 Porcentajes de expresión de FtsZ y FtsA de los diferentes mutantes con respecto a la cepa salvaje.

Tabla 2.1	Cepas utilizadas en este trabajo
Tabla 2.2	Soporte informático.
Tabla 3.1	Posición del nucleótido modificado, naturaleza del cambio de nucleótido y de aminoácido dentro de la región catalítica de la RNasa E de los mutantes termosensibles aislados.
Tabla 3.2	Tiempos de generación de cepas <i>rne</i> Δ1018 portando diferentes alelos de <i>rne</i> en plásmido de 1 copia por célula.
Tabla 3.3	Tiempos de generación de diferentes cepas <i>rne</i> Δ1018 portando diferentes alelos de <i>rne</i> en plásmido de 6-8 copias por célula.
Tabla 3.4	Vidas de los mRNA analizados en los diferentes mutantes.
Tabla 3.5	Longitudes celulares y ratios FtsZ/FtsA en los diferentes mutantes.

A	adenina	NDPs	nucleósidos difosfatos
Ap^r	resistencia a la ampicilina	ncRNA	RNA no codificantes
ARD-1	activador de la degradación del RNA	p	precursor
ARRBS	sitio de unión al RNA rico en argininas	pAp	3' fosfoadenosina 5' fosfato
ATP	adenosina 5'-trifosfato	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
BrEt	bromuro de etidio	PNPasa	polinucleótido fosforolilasa
Bp	pares de base	ppGpp	guanosina tetrafosfato
BSA	Seroalbúmina bovina	RBS	Sito de unión al ribosoma
C	citosa	RNA	Ácido ribonucleico
°C	Grado Celsius	REP	secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas
cap	metil-guanosina	RNasa	ribonucleasa
Ci	curios	rRNA	RNA ribosómico
Cm	cloranfenicol	S	svensson
CR	cantidad relativa	SDD	apagado de expresión por degradación de mRNAs
D	hidrouridina	siRNA	Pequeños RNA interferentes
DNA	ácido desoxirribonucleico	snRNAs	Pequeños RNAs no codificante
dTMP	timidina monofosfato	snoRNAs	Pequeños RNA nucleolares
EDTA	etilendiaminotetraacético	sRNA	Ácido ribonucleico pequeño
Fig.	figura	SRP	partícula de reconocimiento
FP	fracción procesada	TIM	triosafosfato isomerasa
G	guanosina	TIR	inicio de la transcripción
kb	kilobase	™	marca registrada
kDa	kilodalton	tmRNA	RNA transferente mensajero
L	litro	tRNA	RNA transferente
lb/in²	Libras por pulgada ²	U	uracilo
LB	Luria Broth	σ	sigma
Mg⁺²	magnesio	β	beta
miRNAs	microRNAs	α	alfa
mRNA	RNA mensajero	ρ	Factor Rho
ml	mililitro	ψ	pseudouridina

%	tanto por ciento
3'	extremo 3'
5'	extremo 5'
5'-UTR	región no traducida del 5'
μm	micrometro

Introducción

1. Importancia del estudio de la degradación del RNA en *Escherichia coli*.

1.1 *Escherichia coli*: modelo para el estudio de procesos biológicos.

En el campo de la biología molecular, los modelos bacterianos han constituido paradigmas extraordinariamente útiles para la comprensión de los procesos biológicos básicos en modelos mucho más complejos. Varios ejemplos de esto son el conocimiento del código genético, la mutagénesis, la replicación del ácido desoxirribonucleico (DNA), los mecanismos de reparación del DNA, la síntesis del ácido ribonucleico (RNA) o transcripción, la regulación de la expresión génica, la síntesis de proteínas o traducción y las rutas metabólicas. Su conocimiento en bacterias, y en especial en *Escherichia coli*, ha permitido su generalización al resto de los seres vivos e impulsado el comienzo del estudio en otras especies. Hoy en día la bacteria *E. coli* es de especial interés debido a que se sabe mucho más de este organismo procarionte que de cualquier otra forma de vida celular.

E. coli fue aislada por primera vez, de las heces de un niño, en 1885 por el médico pediatra y bacteriólogo alemán Theodor von Escherich (Fig. 1.1), quién la denominó *Bacterium coli* {Escherich, 1885 #748}. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor.

La bacteria *E. coli* (Fig. 1.1) es un bacilo Gram-negativo de aproximadamente 2 μm de largo y 0,7 μm de diámetro perteneciente al orden *Enterobacteriales* e incluida dentro de la clase γ -proteobacteria {Prescott, 1996 #750} {Salyers, 2002 #751}. Es anaerobio facultativo, móvil debido a la presencia de flagelos peritricos (que rodean a la célula) y su temperatura óptima de crecimiento es 37°C, aunque es capaz de crecer a 44°C. Se encuentra generalmente ubicado en el intestino largo de los vertebrados {Wilson, 2005 #749}, incluido el humano, y usualmente como miembro minoritario de la flora bacteriana intestinal normal y, por ende, en las aguas residuales. Puede colonizar también la porción inferior de la uretra y la vagina. Es capaz de causar infecciones intestinales y extraintestinales generalmente severas, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, enfermedades diarreicas, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía Gram-negativa {Salyers, 2002 #751}. El tamaño del genoma de la cepa más comúnmente utilizada en el laboratorio denominada K-12 MG1655, y de otras cepas relacionadas, es de 4.6 kilobases (kb) con un contenido de las bases guanosa y

citosa (G+C) de aproximadamente 50.8 % (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks/lproks.cgi>). Las cepas patógenas de *E. coli* tienen un genoma algo mayor debido a la presencia de islas patogénicas {Hacker, 1997 #709} {Binnewies, 2006 #752} {Hacker, 2000 #753} {Dobrindt, 2004 #754}.

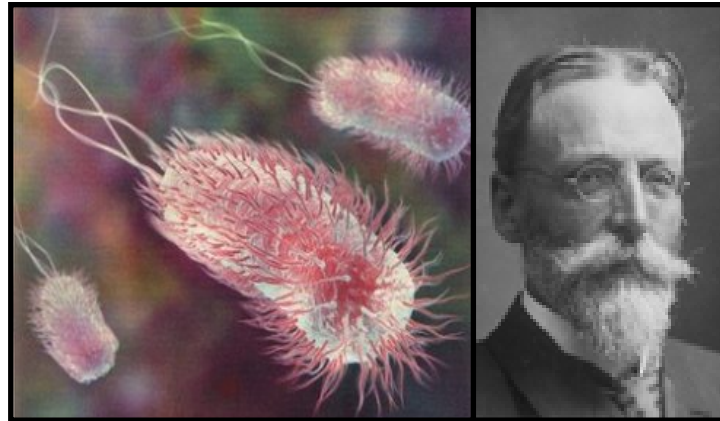


Figura 1.1 *E. coli* y Theodor von Escherich. A la izquierda de la figura se observa la enterobacteria *E. coli* en movimiento y a la derecha su descubridor Theodor von Escherich (1857–1911).

Desde los comienzos de la investigación genética bacteriana, los microbiólogos eligieron este organismo porque era muy accesible, no virulento y crecía rápidamente en medio definido. El primer análisis genético, utilizando a *E. coli* como modelo de estudio, fue realizado por el investigador R. P. Mansini, en 1907, donde describe el aislamiento de unos mutantes no fermentadores de lactosa. A partir de entonces comenzó el estudio de la organización genética y su función con gran detalle. A finales de los años 1930s, fue el organismo de elección gracias a los trabajos realizados en bacteriófagos por investigadores como Wollman {Wollman, 1936 #598} y Bronfenbrenner ({Kalmanson, 1939 #594} {Bronfenbrenner, 1927 #596; Bronfenbrenner, 1927 #595; Bronfenbrenner, 1926 #597}). Esto continuó con los trabajos cruciales de Monod sobre la fisiología del crecimiento y adaptación enzimática {Monod, 1949 #601; Monod, 1947 #602} así como los trabajos llevados a cabo por Delbruck y Luria {Luria, 1943 #599} {Luria, 1947 #600} sobre genética de fagos. Gradualmente *E. coli*, emergió como un ganador sin discusión en el estudio genético, bioquímico y fisiológico de bacterias. A finales de los 1940s, *E. coli* se consagró como principal modelo de estudio en biología molecular por el descubrimiento de la

conjugación por Lederberg {Tatum, 1947 #604} {Lederberg, 1946 #605} y de la transducción por Zinder y Lederberg, {Zinder, 1952 #603} los cuales permitieron un análisis genético detallado y abrió, por primera vez, la posibilidad del intercambio genético entre distintos individuos para obtener organismos con propiedades deseables para cada trabajo. Además, en esta bacteria se ha descubierto mucho de lo que hoy conocemos, a nivel molecular, sobre el funcionamiento de la maquinaria genética de la célula. Por todo ello, podemos decir sin temor a equivocarnos que sin *E. coli* la revolución científica más importante del siglo XX, la era de la genética, jamás hubiese ocurrido.

Debido a que *E. coli* ha sido utilizado como organismo modelo a lo largo de la historia, la mayor parte de nuestros conocimientos actuales en cuanto a fisiología y regulación génica bacteriana están basados en el estudio de este organismo. Históricamente la investigación de la regulación de la expresión génica en *E. coli* se ha centrado principalmente en los mecanismos que controlan el inicio de la transcripción y traducción. En contraste, limitada atención ha recibido el estudio de cómo la degradación del RNA mensajero (mRNA) afecta a los niveles de proteína y al crecimiento celular. La degradación del RNA fue considerada, en un principio, como un proceso constitutivo implicado en la eliminación de aquellos mRNAs inútiles para la traducción y en el reciclaje de ribonucleótidos para la síntesis de nuevas moléculas de RNA. Esta percepción ha cambiado en el tiempo, y hoy en día se acepta que la degradación del RNA juega un papel importante en el control postranscripcional de la expresión génica. La mayoría de las enzimas implicadas en la degradación del RNA en *E. coli* han sido identificadas, se ha determinado la estructura de muchas de ellas y se han establecido modelos de la degradación del RNA. Por tanto, *E. coli* es un organismo muy útil para estudiar la degradación del RNA y un buen “organismo de referencia” para comparar su mecanismo con el de otros organismos estudiados.

1.2 Importancia biológica y biotecnológica de la degradación del RNA en *E. coli*.

Aunque la mayoría de los trabajos experimentales realizados con *E. coli* han sido realizados bajo condiciones definidas en el laboratorio, no hay que olvidar que *E. coli* puede encontrarse en ambientes muy diversos debido a su alta capacidad adaptativa. A menudo este organismo debe enfrentarse a cambios ambientales estresantes, que incluso pueden llegar a poner en peligro su existencia. Por consiguiente, *E. coli*, también puede ser usado como modelo de estudio para comprender cómo los organismos responden a cambios ambientales. Diversas estrategias han permitido a *E. coli* ser altamente adaptativa y muy eficiente, pero dichas estrategias son difíciles de percibir a simple vista. En general, las bacterias responden a cambios de temperatura y disponibilidad de nutrientes mediante rápidos ajustes de la síntesis de moléculas reguladoras. A diferencia de los metazoos, las bacterias y otros organismos unicelulares han generado una serie de sofisticados sistemas sensoriales y reguladores para obtener información del medio interno y externo, y así responder adecuadamente en función de dicha información. Una característica común de todos estos mecanismos es su alta velocidad operativa de respuesta. La mayoría de estas respuestas cursan con la selectiva interrupción de la expresión de macromoléculas específicas mediante mecanismos que incluyen: el bloqueo a nivel de la transcripción o traducción, la degradación del mRNA y la expresión de nuevos genes requeridos para adaptar a la célula a las nuevas condiciones ambientales. Por tanto, la degradación del mRNA es un importante mecanismo de regulación génica postranscripcional, que contribuye a la adaptación de la célula a las nuevas condiciones ambientales de crecimiento. A pesar de los importantes avances realizados en los últimos años en el estudio de la degradación del mRNA, nuestro conocimiento sigue siendo incompleto.

E. coli, no solo mantiene su popularidad como modelo experimental para el conocimiento de procesos biológicos, sino que además, se ha convertido en una herramienta indispensable para la biotecnología y la ingeniería genética. De hecho, es la bacteria más utilizada en los experimentos de genética y biotecnología molecular. La tecnología del DNA recombinante utiliza a *E. coli* como bacteria huésped de vectores y genes clonados. Gracias a las maravillas de la clonación de genes, la industria biotecnológica ha utilizado a *E. coli* para fabricar a gran escala moléculas que se utilizan

en el tratamiento médico de varias enfermedades como por ejemplo la hormona de crecimiento humano, anti-coagulantes, insulina y somatostatina.

Los niveles de un determinado mRNA en la célula y, por consiguiente, la cantidad de proteína específica expresada a partir de dicho mRNA, resultan del balance entre dos procesos opuestos: su síntesis y su degradación. Actuando sobre el promotor pueden conseguirse mayores niveles de transcrito, pero frenando la degradación del mRNA puede lograrse también el mismo efecto. La degradación de los mRNAs es el resultado de una combinación de ataques directos de ribonucleasas (RNasa). La estabilidad o vida media de un mRNA depende de la susceptibilidad a estos ataques de la RNasas, lo cual es función de la secuencia del RNA, de su estructura tridimensional derivada de aquélla y de su asociación con otras macromoléculas (por ejemplo, ribosomas). Por ello, un mejor conocimiento de los mecanismos implicados en la degradación del mRNA y la posible utilización de cepas defectivas en determinadas RNasas implicadas en la degradación del mRNA, así como la fusión de secuencias estabilizantes de RNA a específicos mRNAs contribuirán a un mayor rendimiento de la producción de cualquier proteína en *E. coli*. La cepa comercial BL21 star™ (Invitrogen™), utilizada para la expresión y purificación de proteínas de interés presenta una mutación en el gen de la RNasa E (*rne131*), la cual es la principal responsable de la degradación del mRNA. Además, la región 5' terminal no traducida del mRNA en ocasiones también colabora en la estabilidad del mensajero y, por consiguiente, en un mejor rendimiento en la síntesis de la proteína. Un buen ejemplo es el del mRNA del gen *ompA* de *E. coli*, cuya región no traducida 5' terminal (5'UTR) se ha incorporado a algunos vectores, como en el caso del vector comercial pTriplEx (Clontech, laboratories, Inc) para mejorar el nivel de la expresión de secuencias clonadas. Por tanto, el estudio de la degradación del mRNA en *E. coli* tiene también una enorme importancia biotecnológica.

2. Composición, estructura y síntesis del RNA bacteriano.

2.1 Composición y estructura del RNA.

El RNA es un polímero monocatenario, generalmente, no ramificado formado por monómeros llamados ribonucleótidos. Cada uno de estos ribonucleótidos está formado por una base nitrogenada unida covalentemente a una ribosa y esta a su vez a un grupo fosfato (Fig. 1.2A). Existen cuatro tipos principales de bases nitrogenadas (Fig. 1.2B): dos pirimidinas, citosina (C) y uracilo (U), y dos purinas, adenina (A) y guanosina (G). La unión entre los ribonucleótidos en el RNA es mediada por un enlace 3'-5' fosfodiéster. Además, existen otras bases minoritarias que derivan de las bases principales y están presentes en posiciones muy precisas del RNA, particularmente en el RNA transferente (tRNA) y RNA ribosómico (rRNA) donde las modificaciones químicas de estas bases juegan un papel importante en la función de estas moléculas.

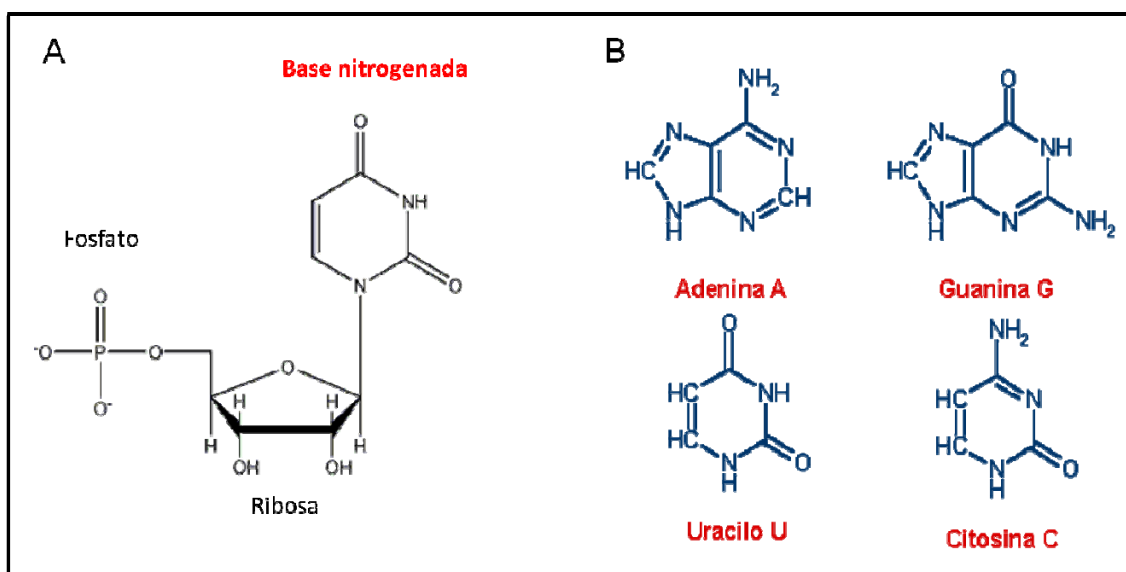


Figura 1.2 Ribonucleótido y bases nitrogenadas del RNA. (A) Estructura química de un ribonucleótido (Uracilo). (B) Representación esquemática de las cuatro principales bases nitrogenadas del RNA.

El RNA presenta una mayor versatilidad estructural, diversidad de conformaciones y reactividad química respecto al DNA. De hecho, las principales funciones biológicas del RNA, particularmente del tRNA, están basadas en la estructura tridimensional específica del RNA. A pesar de que el RNA no posee una estructura regular en doble hélice característica del DNA, posee la capacidad para formar regiones

de doble hélice. Estas regiones en doble hélice pueden formarse naturalmente por orientación antiparalela entre dos cadenas separadas de RNA complementarias, pero más usualmente ocurre entre dos segmentos de la misma cadena plegándose sobre sí misma y formando lo que se denomina un tallo (Fig. 1.3). Estas cortas regiones de una misma cadena implicadas en la formación de la doble cadena suelen estar conectadas por segmentos de cadena sencilla extendidos, que adoptan una forma globular, denominada lazo o bucle (Fig. 1.3). En la mayoría de las especies de RNA, la estructura secundaria predominante es la de tipo tallo-lazo. Sin embargo, este tipo de estructuras frecuentemente muestran un inusual apareamiento de G:U además de los esperados apareamientos de tipo Watson-Crick, A:U y G:C. La estabilidad de la hélice de RNA parece requerir al menos tres convencionales apareamientos y el lazo requiere un mínimo de tres ribonucleótidos. La estructura de doble cadena formada por un lazo de RNA es similar a la forma A del DNA con las bases inclinadas, ya que el grupo 2'-OH de los ribonucleótidos dificulta la formación de la hélice de la forma B (Fig. 1.3). Las regiones helicoidales formadas de esta manera son rara vez regulares.

Es posible predecir dentro de una molécula de RNA secciones de doble hélice mediante análisis bioinformático a partir de las secuencias primarias. Esta técnica ha sido extensamente utilizada para identificar estructuras secundarias y homologías entre una variedad de especies de RNA.

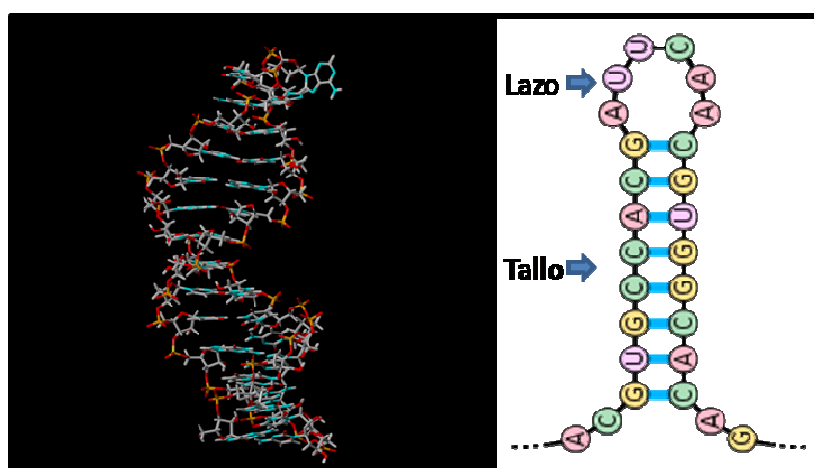


Figura 1.3 Estructura secundaria tipo tallo-lazo del RNA. A la izquierda se observa la estructura secundaria tipo tallo-lazo de una región de 30 ribonucleótidos del genoma de RNA del virus de Cocksackie, determinada mediante resonancia magnética nuclear. A la derecha se representa un ejemplo de estructura tipo tallo-lazo.

2.2 Síntesis del RNA en *E. coli*.

La síntesis del RNA o transcripción se inicia en una región corriente arriba de la secuencia del DNA molde, que debe ser transcrita. Esta región se denomina promotor, y es la secuencia de DNA reconocida por un complejo multiproteico denominado RNA polimerasa {Weiss, 1959 #638} {Hurwitz, 1960 #639} {Huang, 1960 #640} {Stevens, 1960 #641}. En *E. coli*, una única RNA polimerasa es la enzima encargada de la transcripción de todos los genes de su genoma, al contrario que en eucariotas donde existen tres tipos de polimerasas. Su estructura varía en cada una de las tres fases (iniciación, elongación y terminación) en las que se divide el proceso de transcripción. Para el inicio de la transcripción se requiere la enzima completa u holoenzima formada por el núcleo enzimático y la correspondiente subunidad sigma (σ). El núcleo enzimático está formado por la unión no covalente y estable de cuatro polipéptidos: dos monómeros α (cada uno 36,5 kD), un β (150,6 kD) y un β' (de 155,1 kD), productos de los genes *rpoA*, *rpoB* y *rpoC* respectivamente.

Hay muchos tipos de promotores en bacterias, cada uno de los cuales requiere un tipo de subunidad σ diferente presente en la RNA polimerasa {Wagner, 2000 #642} {Hermann, 1988 #643}. La principal subunidad σ en *E. coli* es la σ^{70} {Wagner, 2000 #642}. En condiciones normales de crecimiento la subunidad σ^{70} es necesaria para la transcripción de la mayoría de los genes y operones. Proteínas homólogas a la subunidad σ^{70} han sido encontradas en la mayoría de las bacterias {Paget, 2003 #644}. La subunidad σ contacta con el promotor en dos sitios, el elemento -35 y el elemento -10. Estos elementos son cortas secuencias localizadas a 35 y 10 nucleótidos corriente arriba del sitio inicial de la transcripción y están separadas entre ellas por 17 nucleótidos. En *E. coli*, se puede predecir la existencia de una secuencia promotora por su similitud a la secuencia consenso (secuencia formada por los nucleótidos más frecuentes en cada posición dentro de los elementos -35 y -10 de todas las regiones promotoras analizadas). La secuencia consenso del elemento -35 es 5'-TTGACA-3' y la del elemento -10 es 5'-TATAAT-3' {Wagner, 2000 #642} {Hermann, 1988 #643}. Generalmente, cuanto más similar sea la secuencia de un determinado promotor a la secuencia consenso, se dice que más fuerte será el promotor lo que resultará en una mayor tasa de transcripción.

La subunidad σ de la RNA polimerasa reconoce la región promotora y recluta el resto de las subunidades de la RNA polimerasa {Burgess, 1969 #650} {Travers, 1969 #651}. Esta unión de la RNA polimerasa desestabiliza la estructura del DNA y separa las dos cadenas de DNA formando lo que se denomina una burbuja de transcripción {Wagner, 2000 #642} {Hermann, 1988 #643}. Posteriormente se produce un apareamiento de los ribonucleótidos iniciales por complementariedad de bases a la cadena molde de DNA y la polimerización de los ribonucleótidos comienza. La subunidad σ se libera de la RNA polimerasa holoenzima y la elongación continua hasta alcanzar la secuencia terminadora {Wagner, 2000 #642} {Hermann, 1988 #643}. Una vez que la RNA polimerasa llega a la secuencia terminadora, la elongación de la transcripción cesa, se disocia del DNA molde y libera el RNA precursor o transcrito primario. Todas las señales terminadores conocidas en *E. coli*, y en otras muchas bacterias, pueden ser clasificadas como terminadores dependientes del factor Rho (ρ) o terminadores independiente de ρ {Wagner, 2000 #642} {Hermann, 1988 #643}.

En *E. coli* el terminador independiente de ρ o terminador intrínseco, determina el cese de la transcripción sin la ayuda de ningún factor adicional. El análisis de las secuencias de un gran número de terminadores intrínsecos revela algunas similitudes o motivos que se repiten. Entre ellos está una secuencia con elevado contenido de G y C seguida de unas 8 A en la cadena molde de DNA. La transcripción de esta secuencia da lugar a la formación de una estructura secundaria tipo tallo-lazo, seguida de varias U en el extremo 3' del transcrito (Fig. 1.4). Esta estructura secundaria de RNA es la responsable de la detención de la RNA polimerasa. La secuencia poly-U del transcrito forma un heteroduplex con la secuencia poly-A complementaria de la cadena molde de DNA {Martin, 1980 #645}. Varias pruebas fisicoquímicas proponen que esta hélice híbrida de pares A:U es significativamente menos estable que otras de secuencia diferente, lo que podría contribuir a la liberación del RNA del DNA molde {Martin, 1980 #645}. De hecho, ha sido demostrado que aunque la estructura tallo-lazo y la secuencia poly-U contribuyen a la terminación de la transcripción, estos elementos pueden causar la terminación independientemente uno del otro {Tomizawa, 1987 #646}{Abe, 1996 #647}, lo cual es importante en aquellas bacterias carentes del segmento de poly-U. Además, mediante análisis bioinformático se han identificados varios tipos de

estructuras diferentes como presuntas estructuras terminadoras {Unniraman, 2002 #648}.

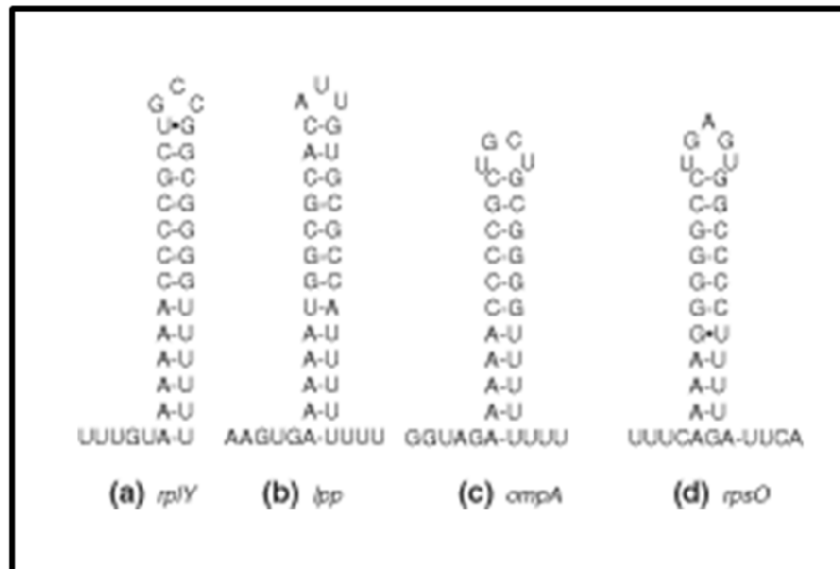


Figura 1.4 Terminadores Rho-independiente. Estructuras secundarias estimadas para los terminadores Rho-independiente de los mRNAs de (a) *rplY*, (b) *lpp*, (c) *OmpA* y (d) *rpsO*. La secuenciación de los cDNAs de estos 4 transcritos han confirmado la naturaleza de extensiones de cadena sencilla en el extremo 3'.

La otra clase de terminación, la terminación dependiente de ρ requiere la acción de la proteína ρ {Roberts, 1969 #649}. El factor ρ es una proteína esencial en *E. coli*, formada por seis polipéptidos idénticos, con actividad RNA:DNA helicasa y con capacidad de unirse al RNA {Wagner, 2000 #642}. Este factor se une al RNA que está siendo transcrito y migra a través del RNA en la dirección de la RNA polimerasa (5' \rightarrow 3'). Cuando la RNA polimerasa disminuye la velocidad de su avance o se detiene en el sitio de terminación de la transcripción, la proteína ρ alcanza el sitio donde está la RNA polimerasa e induce la terminación, presumiblemente a través de una actividad RNA:DNA helicasa.

Los transcritos primarios de *E. coli*, resultantes de la transcripción mediada por la RNA polimerasa, varían enormemente en el número de secuencias codificantes o cistrones que contienen. Algunos transcritos de RNA representan un único gen, denominándose a estos transcritos monocistrónicos. Otros (la mayoría) representan a varios genes en tándem y se denominan policistrónicos. En estos casos, una sola molécula de RNA transcrita porta la secuencia de un grupo de genes adyacentes en el

genoma, tal agrupamiento génico constituye un operón que es controlado como una unidad génica sencilla. En los transcritos policistrónicos los cistrones pueden estar separados por secuencias no funcionales denominadas regiones intercistrónicas o intergénicas.

2.3 Clases de moléculas de RNA en *E. coli*.

La transcripción da origen a cuatro clases principales de RNA en *E. coli*: rRNA, tRNA, mRNA y RNA pequeño no codificante (sRNA).

2.3.1 rRNA.

El rRNA es una clase de RNA presente en los ribosomas y constituye el 60% de la masa total del ribosoma. Además, el rRNA es la clase de RNA más abundante ya que supone el 80% del RNA total de *E. coli*. Existen tres tipos de rRNAs en bacterias: 5S, 16S y 23S.

Los ribosomas son partículas compactas de ribonucleoproteínas implicadas en la traducción del mensaje genético en todos los organismos ({Porse, 1999 #586} {Garrett, 1999 #587}). Están formados por dos subunidades {Ban, 1999 #588}: la subunidad pequeña (30S) constituida por el 16S rRNA y 21 proteínas, mientras que la subunidad larga (50S) está formada por el 23S rRNA, 5S rRNA y 31 proteínas.

En *E. coli*, los genes de los diferentes tipos de rRNAs se encuentran agrupados en siete operones (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG*, y *rrnH*). Cada operón contiene dos promotores en tándem, uno de los cuales responde al ppGpp y el otro está sujeto al control de la tasa de crecimiento. Todos ellos tienen una organización similar (Fig. 1.4) y su secuencia nucleotídica es conocida {Brosius, 1981 #574}. Dentro de cada operón, el gen 16S rRNA está localizado en el extremo 5', mientras el gen 23S rRNA está corriente abajo del 16S rRNA y el gen 5S rRNA es el más próximo al extremo 3' del operón. Todos los operones de rRNA contienen al menos un gen de tRNA situado entre los genes 16S rRNA y 23S rRNA, y algunos contienen varios genes de tRNA corriente abajo del 5S rRNA (Fig. 1.5). Los rRNAs se transcriben inicialmente como un largo precursor policistrónico denominado 30S rRNA, que contiene a los tres genes de rRNA. Las regiones intercistrónica o espaciadoras que flanquean a los 16S y 23S rRNAs, son

altamente conservadas entre los operones y poseen largas repeticiones invertidas, que tienen el potencial para formar tallos de doble cadena {Bram, 1980 #575}. Estas regiones de doble cadena son estables *in vivo* {Young, 1978 #576} y han sido observadas directamente mediante microscopía electrónica ({Klein, 1985 #577}). Durante el procesamiento estas regiones espaciadoras altamente estructuradas son eliminadas.

Los rRNAs son importantes en la estructura y función del ribosoma. Constituyen un armazón al cual se unen las proteínas ribosomales, pero también participan directamente en las actividades del ribosoma. Se conoce la importancia del extremo 3' del rRNA 16S en el reconocimiento de la secuencia Shine-Dalgarno del extremo 5' del mRNA en el inicio de la síntesis de proteínas {Steitz, 1975 #584} y la del extremo 5' de este mismo rRNA en la detección de la terminación de la traducción y en la unión del tRNA {von Ahsen, 1995 #573}. El 23S rRNA posee la actividad peptidil transferasa, lo cual significa que el rRNA 23S es un ribozima, ya que es capaz de catalizar la formación del enlace peptídico por el cual un aminoácido es incorporado en una proteína {Samaha, 1995 #760}. Además, y al igual que el 16S rRNA, el extremo 5' del 23S rRNA está implicado en la unión del tRNA {von Ahsen, 1995 #573}. Varios trabajos sugirieron que el 5S rRNA, en la subunidad 50S, tiene un papel en la unión del aminoácido-tRNA durante la elongación a través de la formación de puentes de hidrógeno entre una secuencia muy conservada en el 5S, CGAA, con la secuencia T ψ CG común a todos los tRNAs menos los de iniciación {Forget, 1967 #581} {Fox, 1975 #585}. Esta secuencia T ψ CG está oculta en la estructura de los tRNA y parece que la unión del anticodón con el codón causa un cambio conformacional del complejo aminoácido-tRNA que hace que esta secuencia pueda quedar más accesible. Sin embargo, posteriormente fue demostrado que esa interacción no es esencial para la síntesis de proteínas {Pace, 1982 #582}. Actualmente se piensa que la importancia del 5S rRNA reside en potenciar la síntesis de proteínas por estabilización de la estructura del ribosoma {Barciszewska, 2001 #583}.

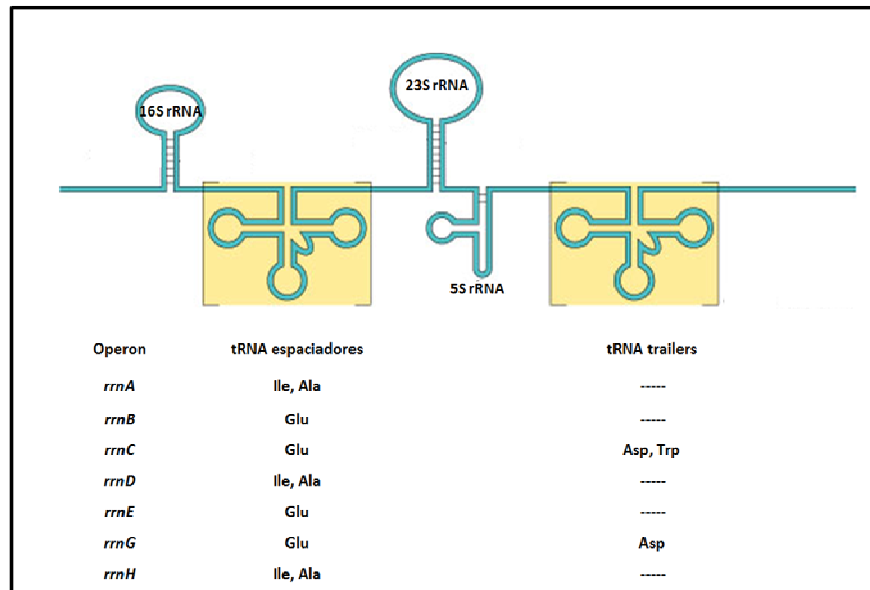


Figura 1.5 Organización de los operones ribosómicos de *E. coli*. Cada operón (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG*, y *rrnH*) contiene el gen 16S rRNA localizado en el extremo 5', el gen 23S rRNA está corriente abajo del 16S rRNA y el gen 5S rRNA en el extremo 3' del operón. Todos los operones de rRNA contienen al menos un gen de tRNA situado entre los genes 16S rRNA y 23S rRNA, y algunos pueden contener varios genes de tRNA corriente abajo del 5S rRNA.

2.3.2 tRNA.

E. coli, posee 86 genes de tRNA, que pueden ser transcritos bien como parte de complejos operones, los cuales pueden también contener múltiples genes tales como rRNAs o mRNAs, o bien pueden ser transcritos monocistrónicos. Independientemente de su organización física, cada precursor de tRNA contiene secuencias extras en los extremos 5' y 3', que posteriormente son eliminadas para generar moléculas de tRNA maduras y funcionales. Al igual que ocurre con los rRNAs, no existen especies de tRNA maduro que provengan directamente de su transcrito primario, todos deben sufrir modificaciones postranscripcionales para ser funcionales. La maduración de los tRNAs requiere la acción de varias RNasas. Los tRNAs maduros poseen una secuencia comprendida entre 74-95 bases. Al igual que los rRNA, los tRNA son también modificados químicamente con varias metilaciones y varias pseudouridinas (ψ). Estas modificaciones postranscripcionales son necesarias para un reconocimiento correcto por parte de la aminoacil-tRNA sintetasa así como para la unión codón-anticodón.

Todos los tRNAs adoptan una estructura secundaria muy conservada en forma de hoja de trébol con cuatro brazos constantes y un brazo adicional presente en los tRNAs más largos (Fig. 1.6). En esta estructura secundaria los dos extremos de

la molécula están unidos. Los brazos presentan estructuras tallo-lazo y son denominados por su función o estructura. El brazo aceptor del aminoácido es un dúplex corto de siete pares de bases que termina con una secuencia CCA-OH en el extremo 3' del tRNA maduro y al cual se une el aminoácido correspondiente. En el extremo opuesto de la molécula se encuentra el brazo del anticodón, formado por un tallo de cadena doble de 5 pares de bases y terminado en un bucle de 7 bases no apareadas, donde se encuentra el anticodón. El brazo T ψ C (timina-pseudouridina-citosina), denominado así por la presencia de ese característico triplete dentro de la secuencia de su lazo, está formado por un tallo de 5 pares de bases y un lazo de 7 bases, y el brazo D, formado por un tallo de 3-4 pares de bases y un bucle de 5-7 bases que con frecuencia contiene la base modificada dihidrouridina (D). Adicionalmente, algunos tRNA tienen un brazo variable de 4-21 bases que son los que determinan las variaciones de tamaño de los tRNA maduros (Fig. 1.6). Los análisis de difracción de rayos X indican que los tRNAs se pliegan formando una estructura terciaria más compacta en forma de L (Fig. 1.6) donde los lazos T ψ C y D están muy cercanos y forman algunos puentes de hidrógeno entre ellos, haciendo que los dos lazos se encuentren perpendiculares. Los dos dominios funcionales más evidentes, el aceptor del aminoácido y el anticodón, quedan bien separados del resto de la molécula.

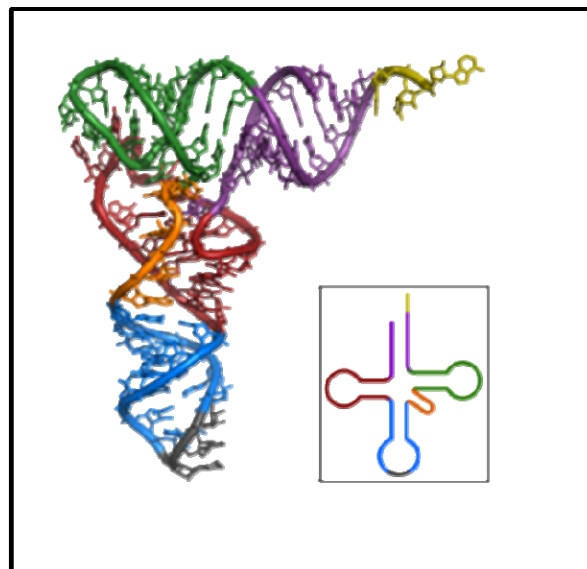


Figura 1.6 Estructura terciaria y secundaria del tRNA. Representación de la estructura terciaria y la secundaria en forma de hoja de trébol del tRNA^{phe} de levadura (recuadro). En amarillo se representa la secuencia CCA-OH en el extremo 3' del tRNA. En púrpura se representa el brazo aceptor. En naranja el brazo variable. En azul el brazo anticodón con el anticodón en gris. En rojo el brazo D y en verde brazo T ψ C.

2.3.3 mRNA.

El mRNA fue descubierto en 1960, como la clase de RNA que determina la secuencia de las proteínas {Brenner S., 1961 #590} {Jacob, 1961 #589} {Gros, 1961 #591}. Las moléculas de mRNA constituyen el 3-5% del RNA total celular de *E. coli*. Estas moléculas son bastante heterogéneas con respecto al tamaño y reflejan la diversidad de los productos génicos, que codifican. Los mRNAs son generalmente menos estructurados y están menos protegidos por proteínas que el tRNA y rRNA. Normalmente, todos los mRNAs bacterianos contienen dos tipos de regiones: la región codificante o cistron y las regiones no traducidas (UTR) en los extremos 5' y 3' del mRNA. En *E. coli* la mayoría de los mRNAs son policistrónicos, pero existen algunos monocistrónicos. La región codificante consiste en una serie de codones, que representan la secuencia de aminoácidos de la proteína, comenzando con el codón de inicio AUG y finalizando con un codón de terminación. La 5'-UTR, denominada también secuencia leader, precede el inicio de la región codificante y contiene el sitio de unión al ribosoma (RBS), mientras la 3'-UTR, también denominada secuencia tráiler, está situada a continuación de la señal de terminación del mRNA (Fig. 1.7). En un mRNA monocistrónico, la UTR está presente en ambos extremos. Aunque estas regiones forman parte de la unidad de transcripción, estas secuencias no codifican para la proteína resultante de la traducción. Las diferentes regiones codificantes de un transcrito policistrónico de mRNA están separadas por las regiones intercistricas, las cuales varían enormemente en tamaño. En bacterias estas regiones pueden llegar a ser tan largas como 30 nucleótidos (e incluso más largos en mRNAs de fagos), pero pueden ser tan cortos, con 1 o 2 nucleótidos de separación entre el codón de terminación para una proteína y el codón iniciador de la siguiente proteína. En un caso extremo, dos genes pueden estar solapados de manera que la última base de una región codificante es también la primera base de la siguiente región codificante.

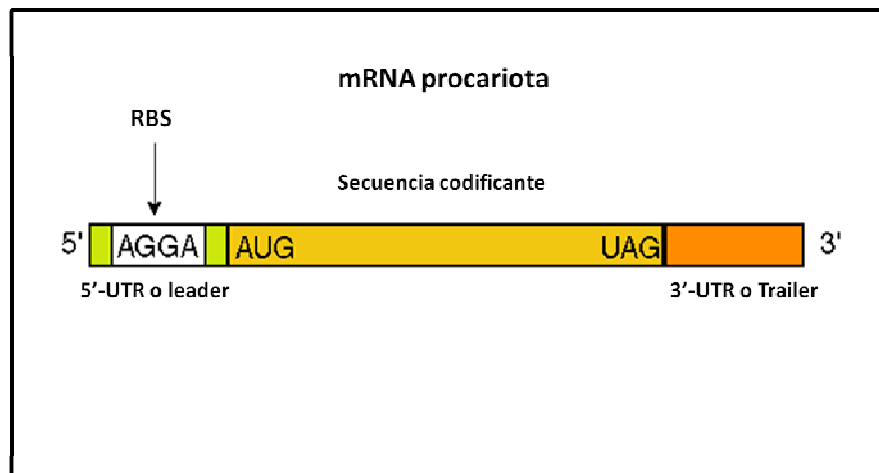


Figura 1.7 Representación de un mRNA procariota monocistrónico. La 5'-UTR o leader, precede el inicio de la región codificante y contiene el sitio de unión al ribosoma (RBS), mientras la 3'-UTR o tráiler, está situada a continuación de la señal de terminación del mRNA.

Han sido identificadas en los extremos 3' de los mRNA de operones y en las regiones intercistónicas {Higgins, 1982 #608} unas secuencias de una longitud de 35 nucleótidos, que pueden controlar la expresión del mRNA, la estabilidad o ambas. Estas secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas (REP) tienen el potencial de formar una región de doble cadena o tallo energéticamente estable. Más de 500 copias residen en el genoma de *E. coli*, pero ninguna ha sido identificada en sus fagos {Stern, 1984 #609}. Estas secuencias son claramente diferentes a los sitios de terminación de la transcripción, aunque ambas regiones contienen estructuras tipo tallo-lazo.

Una modificación postranscripcional importante de los mRNAs bacterianos, es la adición de múltiples adenosinas monofosfato o cola poly(A) al extremo 3'. Se estima que alrededor del 1-2% del RNA total de *E. coli* {Cao, 1992 #611} {Mohanty, 1999 #6} está poliadenilado. Por tanto, los niveles de poliadenilación en *E. coli* son bajos, y al contrario de lo que ocurre en eucariotas, las colas poly(A) parecen jugar un papel desestabilizador de los mRNA {Dreyfus, 2002 #311}.

2.3.4 sRNA.

Los pequeños RNAs no codificantes (ncRNAs o sRNAs) son RNAs de una longitud variable entre 50-400 nucleótidos y no son traducidos a proteínas. Forman la clase más heterogénea de especies de RNA e incluyen RNA reguladores, RNA catalíticos, primers

de RNA, fragmentos de RNA derivados de la reacciones de procesamiento y RNA transferente-mensajero (tmRNA). Por tanto, los sRNAs son una familia de moléculas altamente versátil que posee un amplio rango de actividades biológicas.

Esta clase de moléculas de RNA fue observada por primera vez hace cuatro décadas {Griffin, 1971 #613} {Ikemura, 1973 #614}, pero ni sus genes fueron caracterizados ni su papel funcional fue establecido. Durante los primeros años de los 1980s, y posterior al descubrimiento de la existencia en bacteriófagos, transposones y plásmidos de pequeños RNAs antisentidos implicados en el control del ciclo de vida o en el número de copias, fue caracterizado el primer sRNA codificado por el cromosoma de *E. coli*, un RNA antisentido denominado MicF {Mizuno, 1983 #616} {Mizuno, 1984 #615}. Posteriormente, se han ido describiendo muchos más y en otras bacterias {Vogel, 2005 #636}. Incluso se ha sugerido también la presencia de sRNAs en cloroplasto y mitocondrias {Lung, 2006 #567} actuando como antisenses de mRNAs específicos en estas organelas, las cuales además, poseen su propia población de mRNA, tRNA y rRNA.

En bacterias, los sRNA funcionales pueden ser generados vía procesamiento de transcritos precursores o directamente como transcritos primarios, estos últimos representan el tipo más abundante de sRNA conocido.

Los sRNAs reguladores forman el grupo de sRNA más importante y actúan a nivel postranscripcional. Al igual que ocurre en eucariotas con los microRNAs (miRNAs) y pequeños RNA interferentes (siRNA), los sRNAs reguladores actúan frecuentemente por apareamiento con su mRNA específico modificando el nivel de traducción o la estabilidad del mismo {Mikulik, 2003 #623} {Gottesman, 2004 #624} {Gottesman, 2006 #626} {Vogel, 2007 #627} {Storz, 2004 #617}, pero además pueden actuar mediante la unión a proteínas para modificar su actividad {Repoila, 2009 #565}. La unión de un sRNA al mRNA puede resultar en un bloqueo de la entrada del ribosoma (represión de traducción), una desestabilización de la estructura secundaria inhibitoria, la cual secuestra el sitio de entrada del ribosoma en el mRNA (activación de la traducción) {Majdalani, 2005 #622} {Storz, 2004 #617} o en una degradación del mRNA {Pfeiffer, 2009 #618}. La mayoría de los sRNAs reguladores son producidos en respuesta a condiciones de estrés o cambios metabólicos {Wassarman, 2002 #620}. En *E. coli*, la acción de la mayoría de los sRNAs está casi siempre asociada con una chaperona de

RNA denominada Hfq. Sin embargo, no todos los sRNAs actúan sobre mRNAs. Existen tres sRNAs (6S, CsrB y CsrC) en *E. coli*, y sus homólogos en otras bacterias, que actúan sobre proteínas celulares modulando su actividad {Pichon, 2007 #765}.

Otro tipo de sRNA regulador, que puede ser clasificado como un elemento *cis* sRNA regulador es el riboswitch {Tucker, 2005 #632} {Winkler, 2005 #633} {Edwards, 2007 #634} {Henkin, 2008 #635}. Estos elementos estructurales de RNA son codificados por la misma cadena del mRNA que la contiene y, por tanto, son parte del mismo transcrito. Están localizados en el extremo 5' del mismo transcrito que ellos regulan y en respuesta a un metabolito la estructura del riboswitch cambia para bloquear o promover la traducción {Blount, 2006 #761}.

Además de los sRNAs reguladores que actúan sobre mRNAs o proteínas, el cromosoma de *E. coli* codifica otros tipos de sRNA implicados en diferentes funciones. Entre los más importantes destacan el M1 RNA, el 4.5S sRNA y el tmRNA. El M1 RNA es la subunidad catalítica de la RNasa P, la cual es responsable de la generación de los extremos 5' maduros de los tRNAs {Stark, 1978 #619}. El 4.5 sRNA interacciona con la proteína Ffh formando un complejo ribonucleoproteico denominado señal de la partícula de reconocimiento (SRP) que juega un papel esencial en la secreción de proteínas {Keiler, 1996 #628}. Su interacción con el péptido señal es necesario para trasladar cotraduccionalmente a la proteína naciente a través de la membrana o para integrarla en la membrana. Este mecanismo está universalmente conservado {Halic, 2005 #629} {Egea, 2005 #630}{Shan, 2007 #631}. Los tmRNAs son moléculas de aproximadamente 300 ribonucleótidos de longitud, que simultáneamente funcionan como tRNA y mRNA {Withey, 2002 #764}. Estas moléculas están implicadas en la liberación de los ribosoma atascados en mRNAs defectuosos {Karzai, 2000 #762} {Gillet, 2001 #763}.

Un tipo de sRNA no codificado por el cromosoma son los RNA primers requeridos para la iniciación de la replicación del DNA en *E. coli* y para la replicación discontinua de la cadena retrasada. Estos primers son sintetizado por una RNA polimerasa especial denominada primasa {Griep, 1995 #766}, que se asocia transitoriamente con el complejo de replicación y típicamente sintetiza primers de RNA de entre 11-12 ribonucleótidos {Kitani, 1985 #767}.

3. Procesamiento del RNA en *E. coli*.

El procesamiento o maduración del RNA es la suma de eventos implicados en convertir un transcrito primario en una molécula de RNA funcional. Dentro del metabolismo del RNA, este proceso contribuye a la determinación de la población final de moléculas de RNA dentro de la célula. Para producir moléculas funcionales de RNA a partir de los transcritos primarios, la célula procariota es capaz de realizar tres tipos de reacciones básicas de maduración: primero, conversión de los transcritos policistrónicos precursores en monocistrónicos; segundo, generación de los extremos 5' y 3' de los RNA maduros, eliminando los nucleótidos extra, pero sin alterar las secuencias que darán lugar a los extremos maduros; y tercero, modificaciones químicas en la base nitrogenada o ribosa de los cuatro ribonucleótidos originales en la cadena de RNA. No todas las moléculas de RNAs están sujetas a estos tres tipos de reacciones. Además, la mayoría de los mRNAs en bacterias, no requieren procesamiento para su traducción. En *E. coli* la transcripción y traducción ocurren de forma simultánea en el único compartimento celular a diferencia que en eucariotas donde la maduración ocurre en el núcleo y la traducción en el citosol.

3.1 Procesamiento del rRNA.

La transcripción en *E. coli* de cada uno de los siete operones de rRNA por la RNA polimerasa genera un transcrito primario policistrónico denominado 30S rRNA. Este largo precursor no procesado está formado por una secuencia 5' leader, un precursor del 16S rRNA (p16 rRNA), una secuencia espaciadora conteniendo al menos un tRNA, un precursor del 23S rRNA (p23 rRNA), un precursor del 5S rRNA (p5 rRNA) y una secuencia trailer, la cual puede contener, en algunos operones, uno o varios tRNAs (Fig. 1.5). La distancia entre p23 rRNA y p5 rRNA es de 81 nucleótidos y entre p5 rRNA y la señal de terminación es de 39 nucleótidos en cuatro de los siete operones de rRNA los cuales no contienen tRNAs en la secuencia trailer, y algo más larga en los otros tres operones los cuales contienen tRNAs {King, 1983 #579}. Antes de que la transcripción termine las endorribonucleasas implicadas en el procesamiento actúan sobre el transcrito nascente. Al menos cuatro endorribonucleasas (RNasa III, RNasa G, RNasa E y RNasa P) están implicadas en el procesamiento del rRNA de *E. coli* (Fig. 1.8).

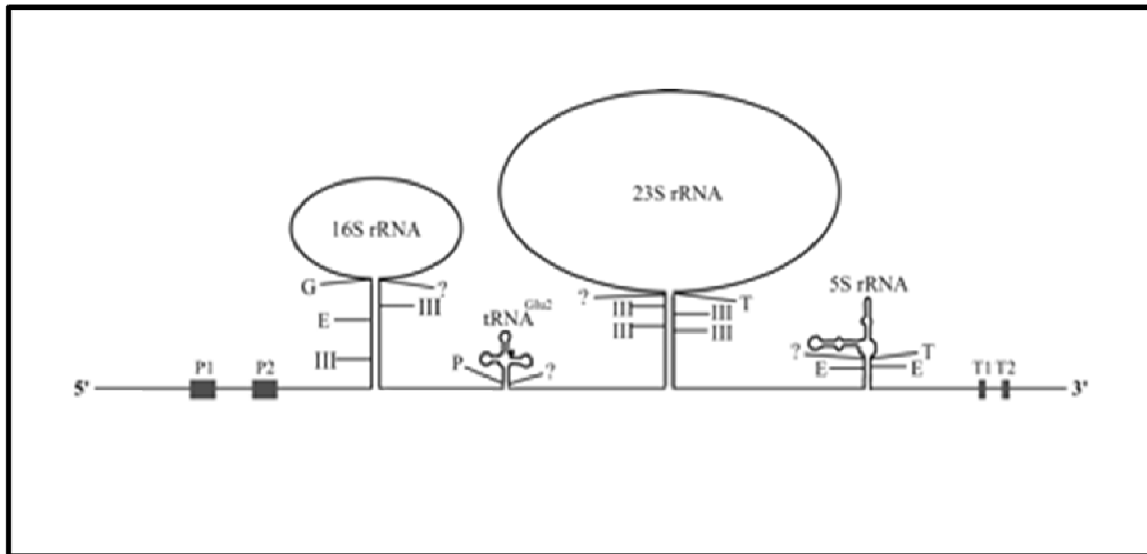


Figura 1.8 Esquemática representación del procesamiento operon *rrnB*. Las especie de rRNA y tRNA, promotores P1 y P2, y terminadores T1 y T2 son indicados así como los sitios de procesamiento de la RNasa III (III), RNasa G (G), RNasa E (E), RNasa P (P), RNasa T (T) y la desconocida RNasa(?).

El primer evento en el procesamiento de los rRNAs consiste en la separación de las diferentes especies de rRNA por la RNasa III {Apirion, 1981 #138}. Al completarse la transcripción del p16 rRNA, las secuencias espaciadoras complementarias, que flanquean a ambos extremos la secuencia del 16S rRNA maduro, se aparean formando una estructura tipo tallo-lazo. El tallo formado es susceptible al corte endonucleolítico por la RNasa III, la cual corta dentro de este dúplex de RNA, liberando el p16 rRNA y el fragmento 5' leader de la cadena de RNA policistrónica en crecimiento. Los 115 nucleótidos en el extremo 5' del p16S son eliminados por la acción cooperativa de la RNasa G y la RNasa E {Li, 1999 #179}. La RNasa E primero corta 66 nucleótidos corriente arriba del extremo maduro 5' del 16S rRNA, un evento que crea un extremo 5' libre en el tallo de p16 e incrementa la tasa a la cual la RNasa G cataliza el paso de maduración final del extremo 5' (Fig. 1.8). Aunque estos dos eventos son posteriores al corte por la RNasa III en la cepa salvaje, se ha observado que en mutantes de la RNasa III también tiene lugar, indicando que el corte inicial de la RNasa III no es crítico para la correcta maduración del extremo 5' del 16S rRNA {Srivastava, 1989 #756}. La enzima responsable de la eliminación de los 33 nucleótidos del extremo 3' del p16S es desconocida, y aunque la eficiencia de la eliminación es dependiente de la maduración del extremo 5',

la correcta maduración del extremo 3' del 16S rRNA tiene lugar en ausencia de la RNasa G y RNasa E *in vivo* {Li, 1999 #179}.

Una vez la región espaciadora localizada entre p16 rRNA y p23 rRNA es transcrita, los tRNAs son liberados mediante cortes endonucleolíticos realizados por la RNasa E en el extremo 3' y por la RNasa P en el extremo 5'. Después de que la RNA polimerasa completa la transcripción del gen 23S rRNA, la RNasa III corta en una región de doble cadena formada por la complementariedad de las secuencias flanqueantes del 23S rRNA liberando al p23 rRNA con 3 o 7 nucleótidos en el extremo 5' y de 7-9 nucleótidos en el extremo 3'. La maduración final del extremo 3' del 23S rRNA es realizado por la RNasa T eliminando exorribonucleolíticamente los nucleótidos extra en el extremo 3' {Li, 1995 #191} mientras la enzima implicada en la maduración del extremo 5' es desconocida (Fig. 1.8).

Tan pronto como la secuencia del 5S rRNA es transcrito y plegado en su conformación característica, ellos son cortados por la RNasa E, mientras región distal o trailer conteniendo tRNAs son eliminados por la RNasa P y otra RNasa, posiblemente la RNasa E. La ausencia de la especie intermediaria 25S rRNA (precursor compuesto por p23 y p5) indica que el p23 y p5 rRNA son separados del rRNA transcrito antes de terminar la transcripción. Está claro que los primeros cortes de procesamiento por las RNasa III y la RNasa E son excesivamente rápidos, de tal manera que virtualmente todos los sitios son cortados en pocos segundos después de la síntesis de la secuencia la cual contiene los sitios diana.

El procesamiento del 5S rRNA requiere también múltiples pasos en *E. coli* (Fig. 1.9). En el mutante termosensible de la RNasa E, *rne-3071*, se observó una acumulación de un particular precursor del 5S rRNA, denominado 9S rRNA, cuando crecía a la temperatura no permisiva ({Ghora, 1978 #492}). Este precursor de aproximadamente 250 ribonucleótidos de longitud contiene la secuencia completa de otra especie precursora del 5S rRNA, así como secuencias extras en ambos extremos {Misra, 1979 #149}. El extremo 5' del 9S rRNA contiene aproximadamente 85 nucleótidos extra mientras que el extremo 3' contiene una estructura tipo tallo-lazo, similar a los sitios de terminación de la transcripción, o tRNAs si ellos están presentes en la secuencia trailer del operón del rRNA. En condiciones normales el precursor 9S rRNA no es observado en

la cepa salvaje, ya que es rápidamente cortado por la RNasa E. El 9S rRNA sufre dos cortes endonucleolíticos consecutivos por la RNasa E generando el p5 rRNA con tres nucleótidos extras en ambos extremos {Ghora, 1978 #492}. La maduración del extremo 3' de este p5 rRNA es catalizada por la RNasa T {Li, 1995 #191} mientras que la enzima implicada en el procesamiento final del extremo 5' no ha sido hasta ahora identificada (Fig. 1.9).

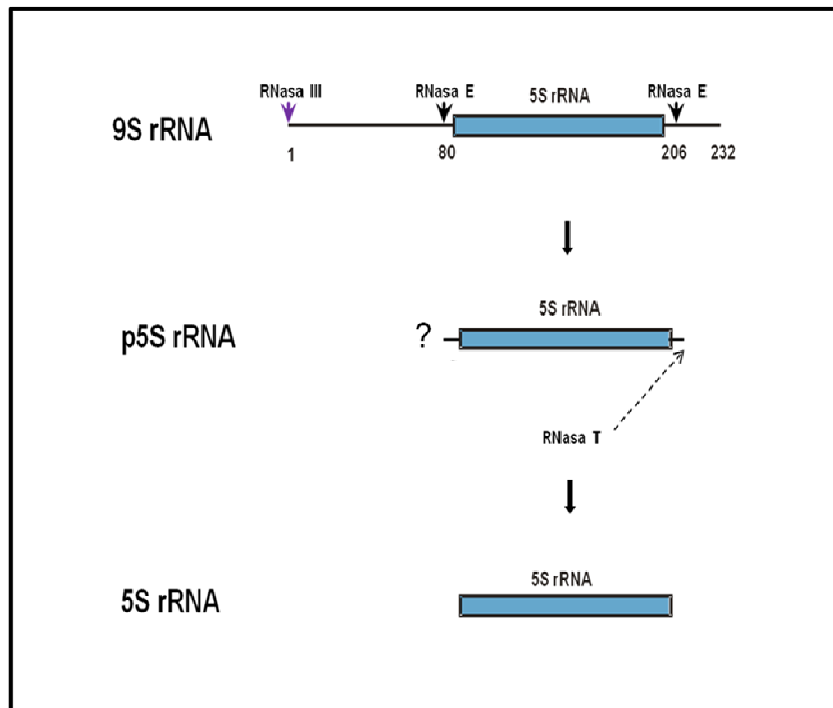


Figura 1.9 Procesamiento del 9S rRNA y maduración del 5S rRNA. Se indican los sitios de corte de la RNasa III y RNasa E sobre el 9S rRNA y la acción de la RNasa T sobre el extremo 3' del p5S rRNA. Se desconoce la RNasa (?) implicada en la maduración del extremo 5' del 5S rRNA.

Una vez procesados, los rRNAs maduros presentan extensas estructuras secundarias y pueden contener bases modificadas. El 5S rRNA maduro está compuesto por 120 nucleótidos ninguno de ellos modificado después de la transcripción y es un componente muy conservado del ribosoma. El 16S rRNA maduro contiene 1.541 nucleótidos, 10 de ellos metilados y uno es una pseudouridina (ϕ). El 23S rRNA maduro consiste en 2.904 nucleótidos que contienen numerosas metilaciones y ϕ . Las modificaciones postranscripcionales sufridas por el rRNA son imprescindibles para un correcto ensamblaje del ribosoma y su posterior funcionalidad.

3.2 Procesamiento del tRNA.

Las moléculas de tRNAs no sólo son importantes para la traducción, sino también para otros procesos celulares tales como la transformación de aminoácidos y la biosíntesis de porfirinas {Söll, 1993 #758}. Para generar moléculas funcionales de tRNA, los precursores de los tRNAs sufren una serie de procesamiento, incluyendo la eliminación de las extensiones de los extremos 3' y 5'. El procesamiento del extremo 5' de los tRNA es similar en todos los reinos y es realizado por la RNasa P, la cual ha sido encontrada en todos los organismos estudiados {Frank, 1998 #759}. Sin embargo, el procesamiento del extremo 3' es mucho menos conocido y difiere entre los diferentes reinos. El procesamiento del extremo 3' es una reacción esencial para la aminoacilación de los tRNAs y por tanto, para la síntesis de proteínas.

En *E. coli*, la mayoría de los tRNAs transcritos son generalmente parte de un RNA policistrónico que codifica varios tRNAs, a veces incluyendo rRNAs o mRNAs {Deutscher, 1985 #224}. Estos tRNA precursores son transcritos con extensiones largas en los extremos 5' y 3'. Una característica común del extremo 3' de todos los tRNAs maduros es la presencia de un triplete CCA. En *E. coli* la secuencia del triplete terminal CCA está contenida en el transcrito primario, ya que esta secuencia está codificada en el genoma de *E. coli* para todos los tRNAs. Sin embargo, en el caso de *Bacillus subtilis*, un porcentaje de tRNAs no poseen el triplete CCA el cual es añadido por la enzima denominada nucleotidil transferasa. La secuencia del procesamiento de los tRNAs de *E. coli* {Apirion, 1993 #363} {Deutscher, 1985 #224} es iniciada por un corte endonucleolítico corriente abajo de la secuencia CCA en el extremo 3' {Sekiya, 1979 #744} seguido por una serie de reacciones de recorte realizadas por exorribonucleasas. A continuación se produce la eliminación de las extensiones 5' por la RNasa P, y una segunda reacción exorribonucleolítica de recorte generando los extremos 3' de los tRNAs maduros (Fig. 1.8).

Las endorribonucleasas RNase E {Ray, 1981 #137} {Ray, 1981 #139} y RNasa III {Apirion, 1993 #363} han sido identificadas como las enzimas responsables del corte endorribonucleolítico inicial en el extremo 3' de los precursores de los tRNAs. La reacción de recorte del extremo 3' que sigue al corte endorribonucleolítico puede ser catalizado por una variedad de exorribonucleasas: seis enzimas diferentes (RNasa II, BN,

D, PH, PNPasa y T) son capaces de catalizar estas reacciones *in vitro* e *in vivo*. Aunque parece haber una preferencia jerárquica en la acción de estas exorribonucleasas en donde la RNasa T y RNasa PH parecen ser las más efectivas. Como en el caso del corte inicial endorribonucleolítico, ninguna de estas exorribonucleasas es específica para la maduración de los tRNAs {Deutscher, 1990 #213}. Esto sugiere, al menos en *E. coli*, que existe un conjunto de endo- y exorribonucleasas, que no son específicas para una determinada clase de RNA (rRNA, tRNA, mRNA y sRNA), sino que reconocen pequeños elementos estructurales comunes a los distintos tipos de RNAs. Al menos en el caso de las exorribonucleasas, estas enzimas tienen funciones redundantes lo que asegura un completo procesamiento de tRNA {Li, 1996 #187}. Debido a que los tRNAs se pliegan en su típica estructura tridimensional durante la transcripción el procesamiento enzimático puede iniciarse cotranscripcionalmente {Apirion, 1983 #745}.

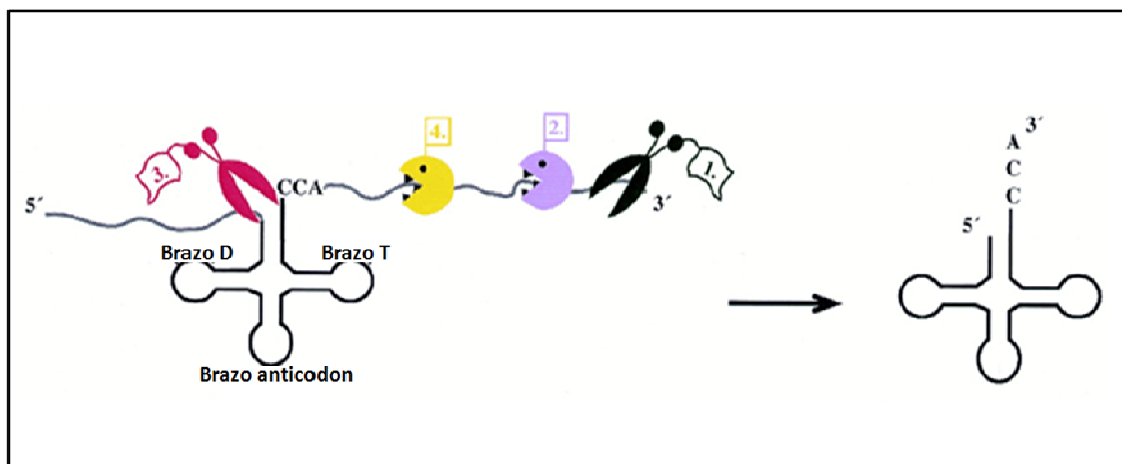


Figura 1.10 Procesamiento de tRNAs en *E. coli*. La etapa inicial en la maduración de los tRNAs, es un corte endonucleolítico realizado por la RNasa E, que ocurre varios nucleótidos corriente abajo del extremo 3' del tRNA (1). A continuación las exorribonucleasas eliminan algunos nucleótidos en el extremo 3' (2), antes de que la RNasa P genere los extremos 5' maduros (3). El resto de los nucleótidos en el extremo 3' son posteriormente exonucleolíticamente eliminados (4). Debido a que la secuencia CCA en los extremos 3' de los tRNAs está codificada en los genes de *E. coli*, la nucleotidil tRNA transferasa tiene sólo función reparadora en esta bacteria.

En eucariotas el procesamiento del extremo 3' ocurre en el núcleo y puede ser posible que el procesamiento este localizado en el nucleolo, como ha sido demostrado para el caso de la RNasa P {Bertrand, 1998 #746}. Los precursores de los tRNAs sintetizados en el núcleo celular contienen cortas extensiones en los extremos 5' y 3' de 5 a 15 nucleótidos y generalmente no codifican para el triplete terminal CCA. En

sistemas *in vitro*, han sido observadas rutas de maduración exo- y endorribonucleolíticas aunque la mayoría de las rutas de procesamiento de los extremos 3' en eucariotas están implicadas solamente cortes endonucleolíticos exactamente en el extremo 3' de los tRNAs {Mayer, 2000 #747}.

En levaduras y otros eucariotas, un largo complejo (300-400 KDa) formado por múltiples 3'-exorribonucleasas, denominado exosoma es responsable del procesamiento de una variedad de *snRNAs* y *snoRNAs*. Algunas de las exorribonucleasas en el exosoma muestran similitud a la RNasa PH de *E. coli* y pueden, por tanto, participar en el procesamiento del extremo 3' del tRNA {van Hoof, 1999 #757}. Sin embargo, el análisis de los mutantes del exosoma en levaduras muestran que el procesamiento del extremo 3' no es impedido, indicando que el exosoma no está implicado en las reacciones de recorte del extremo 3' {van Hoof, 2000 #748}. En las mitocondrias y cloroplastos, los tRNAs están embebidos en largos precursores, los cuales generalmente no codifican el extremo 3'-CCA y muy pocos genes de tRNA contienen intrones {Oda, 1992 #749}. Todas las actividades de procesamiento del extremo 3' de los tRNA de las organelas que han sido analizadas implican cortes endorribonucleolíticos en la secuencia discriminadora o cerca de ella {Mayer, 2000 #747}. En las mitocondrias de levaduras, ratas y plantas, una actividad endorribonucleolítica corta el precursor exactamente en el extremo 3' de la secuencia discriminadora {Manam, 1987 #750} {Chen, 1988 #751} {Kunzmann, 1998 #752}. Sin embargo, en los cloroplastos la maduración del extremo 3' es catalizada por una endorribonucleasa que deja un nucleótido extra. Cuando ese nucleótido es una C, este puede ser usado como la primera posición de la secuencia CCA del extremo 3' de los tRNA funcionales; pero si es diferente debe ser eliminado y sustituido por una C {Oommen, 1992 #753}.

Como en otros organismos, los precursores de tRNA en archeas son transcritos con extensiones en los extremos 5' y 3', y a veces contiene varios genes de tRNAs dentro de un mismo transcrito {Frey, 1990 #759} {Smith, 1997 #760}. Poco es sabido sobre los detalles del procesamiento del tRNA, excepto que la maduración del extremo 5' precede al procesamiento del extremo 3' {Palmer, 1994 #761}. Estudios preliminares sobre el procesamiento del extremo 3' en *Haloferax volcanii* han revelado que una

RNasa Z está implicada en el corte del precursor en la secuencia discriminadora o cerca de ella {Schierling, 2002 #674} sugiriendo que la maduración de tRNAs en arqueas se parece a la ruta endonucleolítica de eucariotas más que al procesamiento en varios pasos de bacterias.

3.3 Procesamiento del mRNA.

La mayoría de los mRNAs bacterianos no requieren procesamiento para su funcional expresión. La primera evidencia sobre el procesamiento de mRNA en procariotas procede de estudios con fagos más que de *E. coli*. A diferencia de los transcritos primarios de rRNA y tRNA, la maduración del mRNA no tiene tanta importancia funcional en *E. coli*. Sin embargo, varios ejemplos de procesamiento de mRNA han sido descritos. Uno de ellos implica el corte endonucleolítico dependiente de la RNasa III del transcrito del operón *rp1JL-rpoBC* en la región intercistronica separando los cistrones de las proteínas ribosomales L10 y L7/L12 de aquellos cistrones de las subunidades β y β' de la RNA polimerasa {Barry, 1980 #681}. Un segundo ejemplo de procesamiento de mRNA por la RNasa III fue encontrado en el operón *rpsO-pnp*, el cual codifica para la proteína ribosomal S15 y la PNPasa, respectivamente {Takata, 1985 #754}. La organización de este operón es compleja. Contiene un promotor fuerte en el extremo proximal del gen *rpsO* y un atenuador transcripcional en la región intercistronica así como dos sitios de procesamiento. Estos sitios de procesamiento presentan estructuras secundarias y están separados por 100 nucleótidos dentro de la región intercistronica {Takata, 1985 #754}.

4. Degradación de RNA en *E. coli*.

4.1 Factores implicados en la degradación del RNA.

Durante los últimos 35 años, el análisis de la expresión génica en *E. coli* se ha centrado en el estudio de los mecanismos de iniciación de la transcripción y traducción. En contraste, limitada atención se ha prestado a comprender cómo la degradación y el procesamiento del mRNA afectan a los niveles de proteínas y al crecimiento celular. Mientras el inicio de la transcripción es un evento importante de la regulación génica, los niveles de un transcrito en crecimiento equilibrado es un factor determinante de la

traducción de los genes. Debido a que los niveles de expresión de un determinado mRNA en crecimiento equilibrado son una función de la tasa de síntesis y de la tasa de degradación, factores que contribuyen a la estabilidad de un transcrito juega un papel significativo en la expresión de la proteína que codifica. Adicionalmente, la disponibilidad de tRNAs maduros es crítica para asegurar que la síntesis de proteína ocurra.

El RNA presente en todas las células vivas puede ser dividido entre RNA estable y RNA inestable. El RNA estable incluye aquellas especies de RNA estructurado tales como el tRNA y rRNA, los cuales son componentes claves de la maquinaria de traducción, mientras el RNA inestable incluye el mRNA. Una importante consecuencia de la inestabilidad del mRNA es que permite a la maquinaria de síntesis de proteínas ajustarse rápidamente a cambios del programa de transcripción de la célula. Por tanto, la inestabilidad del mRNA es una importante propiedad en la regulación de la expresión génica. La inestabilidad del mRNA fue anticipada por Jacques Monod y Francois Jacob antes del descubrimiento del mRNA. Una de sus más importantes predicciones dentro de su modelo operon era que las instrucciones para la síntesis de proteína eran transferidas desde los genes a ribosomas por una molécula mensajera inestable. Esta predicción fue pronto confirmada por el descubrimiento de una nueva clase de RNA altamente inestable {Brenner S., 1961 #590} {Gros, 1961 #591}. El hecho de que el mRNA y su carácter lábil fueran descubierto *in vivo* simultáneamente no fue un accidente; de hecho, la alta tasa de recambio del mRNA fue determinante para la detección de esta clase de RNA, la cual comprende el 4% del RNA total de *E. coli*.

Tan pronto como la transcripción comienza, los ribosomas se unen al extremo 5' del mRNA y comienza la traducción, incluso antes de que el resto del mRNA haya sido sintetizado. Varios ribosomas se mueven a lo largo del mRNA mientras está siendo sintetizado. Cuando la transcripción termina el extremo 3' del mRNA es generado. Los ribosomas continúan traduciendo mientras el mRNA sobrevive. Sin embargo, el mRNA es degradado en una dirección global 5'→ 3' bastante rápido. Por tanto, el mRNA es sintetizado, traducido por los ribosomas y degradado, todo en una rápida sucesión.

En *E. coli* el recambio de mRNA implica múltiples rutas redundantes que implican la acción de endorribonucleasas, exorribonucleasas y otras enzimas que modifican

covalentemente el RNA o afectan su conformación. Las endorribonucleasas inician o aceleran el proceso de degradación del mRNA. La principal endorribonucleasa implicada en este proceso es la RNasa E, la cual es un componente clave de la maquinaria de degradación en *Proteobacteria*. Generalmente la vida media de los transcritos no excede del tiempo de duplicación de *E. coli*. Las tasas de degradación pueden variar ampliamente dentro de una célula. En *E. coli*, por ejemplo, la vida media de los mRNAs pueden ser tan cortas como 20-30 segundos o tan largas como 50 minutos, con tiempos medios típicos de 2-4 minutos. Marcadas diferencias en la estabilidad de mRNAs son comúnmente observadas para transcritos de genes no funcionalmente relacionados y para los diferentes cistrones dentro de un transcrito policistrónico {Blundell, 1972 #755} {Newbury, 1987 #756}{Baga, 1988 #758}.

A pesar de su esencial importancia en la expresión génica, la degradación del mRNA ha sido el mecanismo implicado en la regulación génica más lento en ser elucidado. Los determinantes estructurales de estabilidad e inestabilidad del RNA, factores celulares que degradan el mRNA, y los mecanismos moleculares por los cuales este proceso ocurre, se han empezado a comprender desde hace dos década después de 42 años del descubrimiento de la inestabilidad del mRNA.

4.1.1 Determinantes estructurales de la estabilidad e inestabilidad del mRNA.

En las propias moléculas de mRNA se han identificado un número de elementos estabilizadores que actuando en cis controlan la vida media. En procariotas estos elementos estabilizadores pueden ser divididos en tres clases.

Una clase incluye el grupo 5' trifosfato del nucleótido inicial del transcrito naciente primario. A diferencia de los organismos eucariotas, los mensajeros de *E. coli* no poseen la modificación postranscripcional metil-guanosina (cap) en el extremo 5' del transcrito. Sin embargo, al igual que en los organismos eucariotas, el grupo trifosfato del extremo 5' ofrece una protección frente a la degradación. De hecho, recientemente ha sido descubierta en *E. coli*, una enzima capaz de convertir el extremo 5' trifosfato en monofosfato {Deana, 2008 #33}{Celesnik, 2007 #34}.

Otra clase de elemento estabilizador frente a la degradación del mRNA es la

presencia de estructuras tipo tallo-lazo en los extremos 5' de determinados transcritos que presentan una larga vida media. La mayoría de estas 5'-UTR estructuradas son capaces de estabilizar lábiles mRNAs cuando se fusionan corriente abajo, generando mRNA heterólogos más estables. La influencia del extremo 5' en la degradación del mRNA es debido al efecto protector que provoca el apareamiento de bases en el extremo 5' lo cual afecta las actividades catalíticas de la endorribonucleasa RNasa E y de su paróloga RNasa G.

La última clase de elementos estabilizantes descrita hasta ahora son los extremos 3' y las regiones intercistrónicas con estructuras tipo tallo-lazo, las cuales impiden la iniciación o la propagación de la digestión desde el extremo 3' por las exorribonucleasas. Por ello, los transcritos con terminación Rho independiente protegen al mRNA de la degradación por 3' exorribonucleasas ({Steege, 2000 #741}{Belasco, 1988 #50}{Regnier, 2000 #725}). Como regla general, un extremo 3' con estructura tallo-lazo es esencial para que un transcrito de RNA sobreviva en el citoplasma más que unos pocos segundos. Se especula, que durante la transcripción, el extremo 3' de los transcritos nacientes protege de las 3' exorribonucleasas por el complejo de elongación de la RNA polimerasa. En los mRNAs policistrónicos, las unidades codificadoras localizadas próximas al extremo 5' del transcrito naciente son marcadamente más estables que el resto de los transcritos cuando presentan una estructura tallo-lazo localizada dentro de la región intercistrónica que la separa del siguiente cistron. Después de que una endorribonucleasa corta dentro de la región más lábil del segmento 3' del transcrito policistrónico (Fig. 1.11) la estructura tallo-lazo de la región intercistrónica que queda en el extremo 3' del fragmento 5' generado, previene la propagación de la degradación exorribonucleolítica desde el fragmento 3' hacia el fragmento 5'. Por tanto, el fragmento 5' presentará una mayor vida media. Esto explica por qué dentro de un RNA policistrónico existan cistrones con diferentes vidas medias.

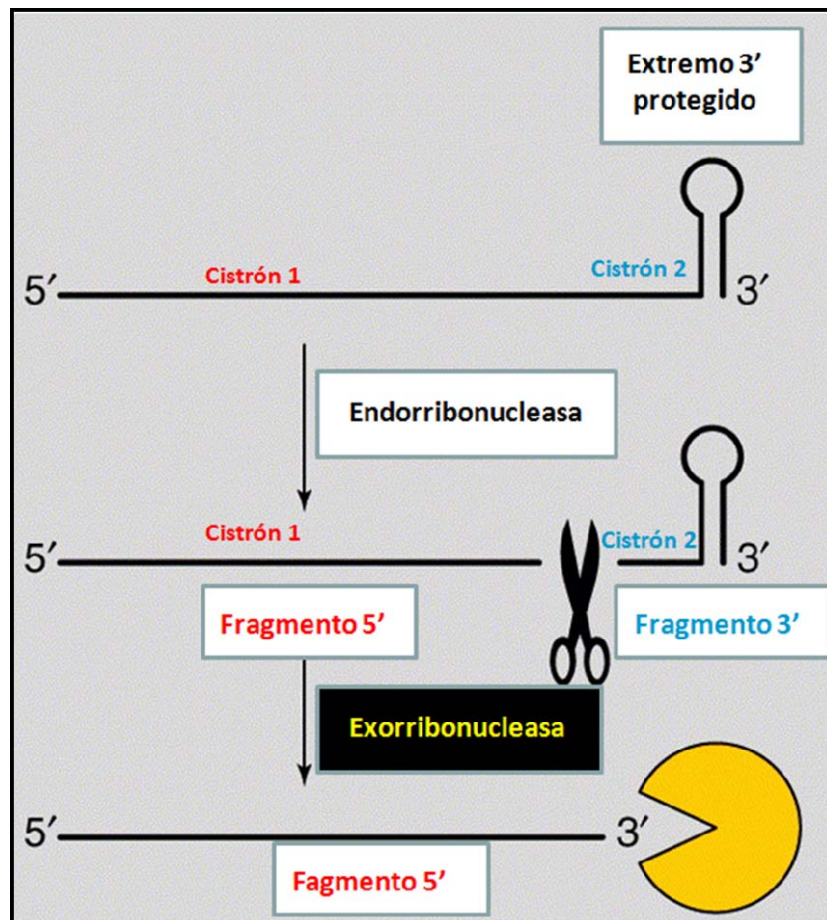


Figura 1.11 Degradación de mRNA en *E. coli*. El extremo 3' del mRNA es protegido del ataque de exonucleasas mediante la estructura secundaria tipo tallo-lazo. La endorribonucleasa (tijeras) corta corriente arriba del tallo-lazo generando dos fragmentos: fragmento 5' y fragmento 3'. El extremo libre 3' del fragmento 5' es luego atacado por exorribonucleasa (amarillo).

4.1.2 Enzimas implicadas en la degradación y procesamiento del RNA en *E. coli*.

El procesamiento y la degradación del RNA son importantes eventos celulares para la supervivencia y la adaptación de *E. coli* a cambios ambientales {Nierlich, 1996 #554}. Estos procesos son catalizados por diversas enzimas que operan en los diferentes pasos de dichos procesos. Las RNasas son enzimas implicadas en la rotura de los enlaces fosfodiéster de la cadena del RNA y pueden ser divididas dentro de dos categorías basadas en su modo de acción sobre el RNA: exorribonucleasas y endorribonucleasas.

4.1.2.1 Exorribonucleasas.

Las exorribonucleasas son enzimas implicadas en la degradación del RNA, comenzando su acción desde el extremo 3' o 5' del RNA sustrato y eliminando un ribonucleótido en cada reacción catalítica. Dependiendo de su mecanismo de acción la rotura del enlace fosfodiéster de la cadena del RNA puede ser hidrolítica o fosforolítica. Las exorribonucleasas hidrolíticas usan agua y liberan nucleótidos monofosfato, mientras las exorribonucleasas fosforolíticas usan fosfato inorgánico y liberan nucleótidos difosfato (Fig. 1.12). Estas enzimas pueden ser clasificadas en función de la dirección de su acción catalítica en: 3' exorribonucleasas y 5' exorribonucleasas. Las 3' exorribonucleasas comienzan en el extremo 3' del RNA y progresan hacia el extremo 5' presentando, por tanto, una direccionalidad 3'→5', mientras que las 5' exorribonucleasas inician su acción en el extremo 5' y se extiende hacia el extremo 3', presentando una direccionalidad 5'→3'. Sin embargo, en *E. coli* no parece haber ninguna exorribonucleasa con actividad 5'→3' {Deutscher, 1993 #194}. Esto está en contraste con lo que ocurre en *Saccharomyces cerevisiae*, en la cual la mayoría de los mRNA son degradados por la exorribonucleasa Xrn, en sentido 5'→3' {Larimer, 1992 #666} {Caponigro, 1996 #455}. Las principales exorribonucleasas implicadas en el procesamiento y degradación del RNA en *E. coli* son la PNPasa, la RNasa II, la RNasa R y la oligorribonucleasa.

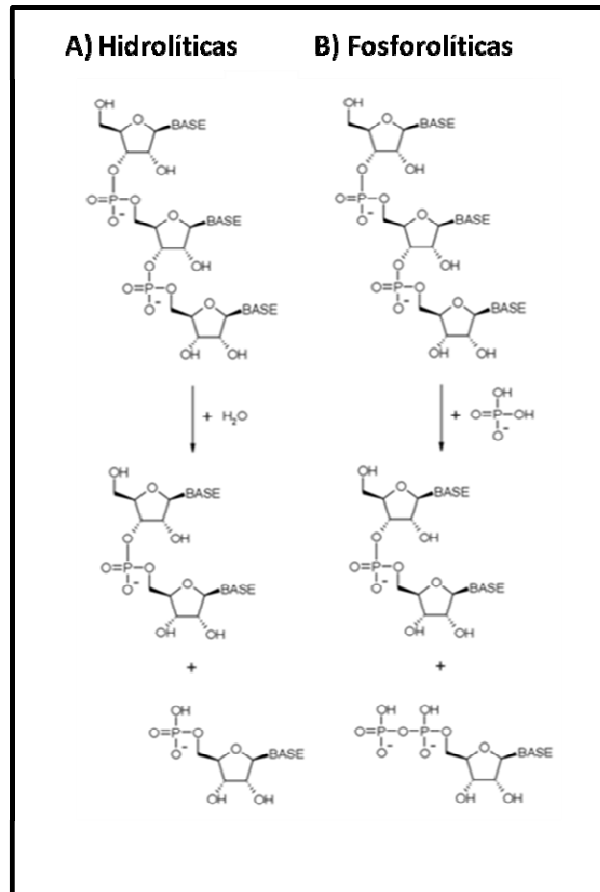


Figura 1.12 Acción catalítica de la exorribonucleasas. (A) Exorribonucleasas hidrolíticas usan agua y liberan nucleótidos monofosfato. (B) Exorribonucleasas fosforolíticas usan fosfato inorgánico y liberan nucleótidos difosfato

4.1.2.1.1 PNPasa

La polinucleótido fosforililasa (PNPasa) fue identificada por primera vez en 1956 y ha sido extensamente estudiada {Littauer, 1957 #653} {Soreq, 1977 #652}. Esta 3' exorribonucleasa consiste en un homotrímero, que degrada, fosforolíticamente, cualquier polirribonucleótido independientemente de su secuencia o composición de bases desde el extremo 3' {Soreq, 1977 #652}. Sin embargo, el progreso de esta enzima es inhibido por la presencia de estructuras secundarias {Spickler, 2000 #335}.

El gen *pnp* codifica la subunidad catalítica α de la PNPasa, que posee un peso molecular de 86 kD {Regnier, 1987 #661}. Esta subunidad presenta en la región N-terminal dos dominios de la RNasa PH en tándem unidos por un dominio α -hélice, mientras que el extremo C-terminal de la PNPasa posee dos dominios de unión al RNA, S1 y KH. La resolución de la estructura cristalina de la PNPasa ha revelado que los seis

dominios RNasa PH de la forma trimérica de la PNPasa se ensamblan formando una estructura tipo anillo con los dominios de unión al RNA en la parte superior del anillo {Symmons, 2002 #293}. Esta organización es similar a la encontrada en el complejo multienzimático implicado en la degradación de RNA en eucariotas y arqueobacterias denominado exosoma {van Hoof, 1999 #757} {Lorentzen, 2005 #662; Lorentzen, 2005 #663} indicando relaciones evolutivas de la estructura y función entre la PNPasa y los exosomas en la degradación del RNA {Symmons, 2002 #293} {Lin-Chao, 2007 #384}. En el centro del anillo hexamérico de la PNPasa existe un canal central, el cual contiene en su interior una serie de argininas implicadas en la unión al RNA y en la catálisis {Shi, 2008 #659}. La PNPasa de *E.coli* está localizada en el citoplasma y una pequeña fracción de la enzima está asociada con la RNasa E en el complejo proteico denominado degradosoma ({Carpousis, 1994 #303}{Liou, 2001 #68}).

La constante de equilibrio de la reacción catalizada por esta enzima es próxima a uno, de modo que a baja concentración de fosfato inorgánico la enzima sintetizará RNA usando nucleósidos difosfatos (NDPs) como precursores, según la siguiente reacción: $\text{poly(nucleósidos-P)}_n + n\text{Pi} \leftrightarrow n \text{NDPs}$. Sin embargo, debido a que ha sido demostrado que la concentración de fosfato inorgánico intracelular oscila entre 8 y 13 mM {Moreau, 2001 #654}, se asume que la PNasa actúa *in vivo* como una enzima degradadora de RNA. Análisis genómicos en *E. coli*, indican que la PNPasa es la principal exorribonucleasa implicada en la degradación del RNA {Mohanty, 2003 #12}. Sin embargo, experimentos *in vivo* han demostrado que la PNPasa también puede actuar poliadenilando el RNA y, por tanto, funcionando como una poly (A) polimerasa {Mohanty, 2000 #655}. Además, trabajos experimentales indican que en la cianobacteria *Synechocystis sp.* y en *Streptococcus coelicolor*, la poliadenilación es realizada por la PNPasa y no por la poly (A) polimerasa {Rott, 2003 #656} {Sohlberg, 2003 #657}. Por otro lado, también ha sido demostrado que esta enzima participa en la maduración de los tRNAs. Aunque *E. coli* posee una segunda exorribonucleasa fosforolítica denominada RNasa PH, que es funcionalmente homóloga a la PNPasa y a otras exonucleasas del exosoma de eucariotas, esta enzima no está implicada ni en la poliadenilación {Mohanty, 1999 #658} ni en la degradación de mRNA (B. Mohanty y S. R. Kushner datos no publicados).

4.1.2.1.2 RNasa II

La RNasa II es un polipéptido de 80 kDa codificado por el gen *rnb* {Donovan, 1983 #2}. Existen similitudes entre la RNasa II y la PNPasa en muchos aspectos {Nossal, 1968 #742} {Singer, 1965 #743} {Gupta, 1977 #744}. Presenta un dominio S1 similar a la PNPasa y RNasa E {Bycroft, 1997 #664}. Esta enzima posee una actividad exorribonucleasa 3'→5' independiente de la secuencia y requiere iones de K⁺ y Mg²⁺ para realizar su acción catalítica a la máxima eficiencia. A diferencia de la PNPasa, la RNasa II degrada el RNA mediante un mecanismo hidrolítico {Chaney, 1972 #746} {Deutscher, 1991 #207} y es más sensible a las estructuras secundarias del RNA {Nossal, 1968 #742} {Gupta, 1977 #744} {McLaren, 1991 #745}. Se ha demostrado que la RNasa II degrada moléculas de RNA desde su extremo 3' hasta encontrarse con estructuras secundarias tipo tallo-lazo {Spickler, 2000 #335}. En este punto, la RNasa II se disocia y la molécula de RNA resultante dejará de ser sustrato para la RNasa II o PNPasa {Coburn, 1996 #342}.

4.1.2.1.3 RNasa R

La RNasa R de *E. coli* es codificada por el locus *vac/rnr*, un gen que fue originalmente demostrado estar implicado en virulencia {Cheng, 1998 #182}. La RNasa R tiene propiedades catalíticas similares a la RNasa II y está significativamente relacionada con la misma a nivel de aminoácidos. Mutantes doble de la PNPasa y la RNasa R son inviables {Cheng, 1998 #182}. La pérdida de la viabilidad celular en los dobles mutantes ha sido atribuida a un defecto en la degradación de rRNAs, los cuales se acumulan en la célula e interfieren con la maduración de los ribosomas {Cheng, 2003 #167}. En contraste, el doble mutante RNasa II RNasa R muestra solamente pequeñas alteraciones en el crecimiento al compararlo con cualquiera de los mutantes sencillo (resultados no publicados).

4.1.2.1.4 Oligorribonucleasa

Ninguna de las 3' exorribonucleasas descritas anteriormente puede degradar eficientemente los últimos ribonucleótidos de una cadena de RNA. La oligorribonucleasa, codificada por el gen *orn*, es una 3' exorribonucleasa específica de

oligorribonucleótidos pequeños {Niyogi, 1975 #665} {Zhang, 1998 #183} e implicada en los últimos eventos de la degradación del RNA {Ghosh, 1999 #180}. Por tanto, la oligorribonucleasa actúa como una enzima limpiadora de los oligorribonucleótidos de tamaño pequeño generados por las PNasa, RNasa II o RNasa R. Además, experimentos *in vitro* han demostrado la capacidad de la oligorribonucleasa para degradar pequeños oligonucleótidos de DNA {Mechold, 2006 #547}.

Al ser la oligorribonucleasa una enzima esencial para la viabilidad de *E. coli*, el estudio de mutantes termosensibles es importante para analizar el papel fisiológico de esta enzima. En el análisis de un mutante termosensible de esta enzima se observó una acumulación de oligorribonucleótidos de entre 2 y 5 nucleótidos de longitud a la temperatura en la cual la oligorribonucleasa se inactiva {Ghosh, 1999 #180}. Su actividad también puede ser inhibida por altos niveles intracelulares de 3' fosfoadenosina 5' fosfato (pAp) que se acumulan en respuesta al estrés por litio {Mechold, 2006 #547}. La observación de que la oligorribonucleasa es esencial para la viabilidad de *E. coli* y que enzimas relacionadas han sido encontradas en otros organismos procariotas y eucariotas, sugieren un importante papel para esta familia de enzimas en el metabolismo del RNA. Actualmente, no se sabe exactamente por qué esta habilidad de la oligorribonucleasa para degradar oligonucleótidos de pequeño tamaño puede ser esencial para *E. coli*, aunque se ha sugerido que la acumulación de pequeños oligorribonucleótidos es deletérea, bien porque disminuye el pool de ribonucleótidos libres o bien porque la acumulación de una alta concentración de oligorribonucleótidos inhibe la acción de otras enzimas importantes de *E. coli* {Ghosh, 1999 #180} {Deutscher, 2006 #162}.

4.1.2.2 Endorribonucleasas.

Las endorribonucleasas son enzimas que cortan internamente el RNA mediante la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster, generando dos fragmentos de RNA, denominados fragmento 5', el cual conserva el extremo 5' original del RNA cortado, y el fragmento 3', que conserva el extremo 3' original (Fig. 1.11). La actividad de las endorribonucleasas es similar a las enzimas de restricción de DNA. Sin embargo, una importante diferencia es que la mayoría de las endorribonucleasas no son necesariamente específicas de secuencia. Clásicos ejemplos, en *E. coli*, de enzimas

específicas de RNA de cadena sencilla y de RNA de cadena doble son la RNasa E y la RNasa III, respectivamente. Algunas endorribonucleasas reconocen estructuras más complejas como es el caso de la RNasa P, implicada en el procesamiento del tRNA. Endorribonucleasas específicas de secuencia incluye la endorribonucleasa RegB del bacteriófago T4, la cual tiene preferencias por las secuencias GAGG en la región de inicio de la transcripción (TIR) de los mRNAs, y las endorribonucleasas específicas de secuencias codificadas por ciertos sistemas toxina-antitoxina, que reconocen cortas secuencias de cadena sencilla (normalmente tan cortos como tripletes) dentro del RNA {Buts, 2005 #763} {Gerdes, 2005 #494} {Condon, 2006 #512} {Pellegrini, 2005 #519}

4.1.2.2.1 RNasa Z.

El gen *elaC* de *E. coli* codifica para una proteína perteneciente a la familia de proteínas altamente conservada denominada ELAC1/2, representada en procariotas, eucariotas y arquea {Tavtigian, 2001 #672} {Schiffer, 2002 #673}. En *Arabidopsis thaliana*, *Bacillus subtilis*, *Haloferax volcanii* y *Drosophila melanogaster* existen miembros de la familia de ELAC1/2, que codifican para una endorribonucleasa, designada RNasa Z, implicada en el procesamiento de precursores de tRNA que carecen del extremo 3' CCA {Schierling, 2002 #674} {Schiffer, 2002 #673} {Pellegrini, 2003 #522} {Dubrovsky, 2004 #675}. Sin embargo, no es activa frente a los tRNAs, cuya secuencia genómica posee la secuencia CCA en el extremo 3' {Pellegrini, 2003 #522}. La RNasa Z corta los precursores de tRNA carentes del extremo 3' CCA generando sustratos para la tRNA nucleotidil transferasa, la cual adiciona el triplete CCA al extremo 3' para producir moléculas de tRNA maduro {Schiffer, 2002 #673}. Además, recientes experimentos han demostrado que la proteína codificada por el gen *elaC* de *E. coli* es una fosfodiesterasa dependiente de Zn^{++} *in vitro* {Vogel, 2002 #676} {Schilling, 2005 #677}.

En *Bacillus subtilis* el 50% de sus genes tRNAs no poseen CCA y ha sido demostrado que la RNasa Z es esencial para la maduración de estos tRNAs {Pellegrini, 2003 #522}. Por tanto, en un principio se sugirió que el gen *elaC* podría ser esencial para *E. coli* y estar implicado en la maduración de los extremo 3' de los tRNAs {Schiffer, 2002 #673}. Sin embargo, a diferencia de *Bacillus subtilis*, todos los genes de tRNAs de *E. coli* codifican pre-tRNAs conteniendo el trinucleótido CCA en el extremo 3' {Blattner,

1997 #679} lo cual hace innecesaria la acción de la RNasa Z en la maduración de los tRNAs.

Para ayudar a determinar cuál era la función biológica de la RNasa Z en *E. coli*, se analizó la delección del gen *elaC* en *E. coli*. Sorprendentemente, este mutante era viable y no mostraba ningún cambio en cuanto a las propiedades de crecimiento con respecto a la cepa salvaje {Schilling, 2004 #678}. El análisis de una serie de cepas isogénicas de *E. coli* portando mutaciones en el gen *rne* y *elaC* proporcionó interesantes resultados: la RNasa Z de *E. coli* es funcional, no está implicada en el procesamiento de los precursores de los tRNAs, pero sí en la degradación de mRNAs en *E. coli*. En crecimiento equilibrado, los niveles de más de 150 transcritos, incluyendo *rpsT*, *cpsE*, *htpG*, *glpQ* y *adhE* {Ow, 2003 #27}, se encuentran incrementados en un mutante de *E. coli* delecionado para el gen de la RNasa Z. Esta nueva función de la RNasa Z podría ser de particular interés debido a que muchas bacterias Gram positivas tales como *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* no contienen RNasa E o RNasa G {Perwez, 2006 #28}.

4.1.2.2.2 RNasa III

La RNasa III fue descubierta como una enzima que corta RNA de cadena doble {Robertson, 1967 #474}. Esta endorribonucleasa es un homodímero constituido por subunidades idénticas de 25.5 kDa, codificadas por el gen *rnc* {Robertson, 1975 #472}. Posteriormente fue demostrado que la RNasa III estaba implicada en el procesamiento del precursor 30S rRNA para generar las especies 16S y 23S rRNA {Dunn, 1973 #478}. *In vivo* la enzima reconoce estructuras secundarias tipo tallo-lazo y corta en una o ambas cadenas del tallo del RNA. Aunque su principal papel fisiológico parece estar relacionado con el procesamiento de los precursores de rRNA, la RNasa III puede iniciar la degradación de una serie de mRNAs incluyendo el transcrito de la PNPasa, el cual contiene una estructura tipo tallo-lazo en el extremo 5' {Portier, 1987 #682}. Otros sustratos de la RNasa III son la regiones intercistrónicas o intergénicas de los transcritos *rplL-rpoB* {Barry, 1980 #681}, *rpsO-pnp* {Portier, 1987 #682} {Takata, 1987 #683}, *dicA-dicF-dicB* {Faubladier, 1990 #684} y *metY-nusA* {Regnier, 1989 #685}. En general, la mayoría de los sitios de corte de la RNasa III están localizado corriente abajo o arriba de la región codificante. Además, ha sido demostrada la unión de la RNasa III a la 5'-UTR

del transcrito *cIII* del fago λ . Esta unión altera la conformación del mRNA y alivia por otro lado la estructura inhibitoria de la traducción {Oppenheim, 1993 #687} {Altuvia, 1987 #688}. Por tanto, la RNasa III está implicada en al menos dos mecanismos reguladores postranscripcionales, los cuales son facilitados por su unión al RNA y/o degradación del RNA.

En *E. coli*, la delección del gen *rnc* sólo provoca una reducción de la tasa de crecimiento {Babitzke, 1993 #5} {Takiff, 1989 #686}. En la cepa defectiva para la RNasa III, se sigue generando rRNA maduro indicando la existencia de una ruta de procesamiento del rRNA independiente de la RNasa III. En contraste, la RNasa III es esencial para la viabilidad de *B. subtilis* {Herskovitz, 2000 #680}.

4.1.2.2.3 RNasa G

E. coli contiene una paróloga de la RNasa E denominada, endorribonucleasa G (RNasa G) {McDowall, 1993 #264} {McDowall, 1996 #260} {Taraseviciene, 1995 #667}. La RNasa G fue originalmente identificada como una proteína (CafA) implicada en la formación del filamento axial citoplasmático {Okada, 1994 #279}. Inicialmente fue observado que la sobreproducción de la proteína CafA provocaba cambios morfológicos caracterizados por la formación de cadenas de células anucleadas conteniendo largos filamentos axiales en su interior {Okada, 1994 #279}. El gen *cafA* (ahora llamado *rng*) se encuentra localizado corriente abajo de los genes *mreB*, *mreC* y *mreD*, todos ellos implicados en la determinación de la forma celular. Posteriormente se observó una considerable similitud (34.1 %) entre las secuencias de la proteína CafA y los primeros 488 aminoácidos del extremo N-terminal de la RNasa E {Wachi, 1997 #278} {McDowall, 1993 #264}. Estudios realizados por Li y colaboradores {Li, 1999 #179} y por Wachi y colaboradores {Wachi, 1999 #277} demostraron que la proteína CafA, ahora llamada RNasa G, es en efecto una endorribonucleasa al igual que la RNasa E.

La RNasa G purificada tiene similares propiedades catalíticas *in vitro* a la RNasa E, ambas son extremo 5' dependiente, ya que muestran una preferencia por aquellos sustratos de RNA 5' monofosforilados sobre aquellos 5' trifosforilados {Tock, 2000 #257} {Mackie, 1998 #338} {Mackie, 2000 #334} {Jiang, 2000 #41}. La RNasa G *in vitro* es capaz de cortar dos sustratos de la RNasa E (RNA I y el extremo 5' de la región 5'-UTR

del transcrito *ompA*), pero en sitios diferentes a aquellos que reconoce la RNasa E {Tock, 2000 #257}. Al igual que la RNasa E, la RNasa G está implicada en la maduración del extremo 5' del 16S rRNA {Wachi, 1999 #277}. La RNasa G cataliza la conversión del precursor rRNA 16.3S en rRNA16S, aunque esta reacción también puede ser catalizada por la RNasa E, pero con menos eficiencia {Wachi, 1999 #277}. Todos estos datos experimentales sugieren que la RNasa E y la RNasa G poseen similares, pero no idénticas, secuencias de reconocimiento y que ellas pueden reconocer la secuencia de su paróloga menos eficientemente. Sin embargo, y a diferencia de la RNasa E, la inactivación de la RNasa G no provoca ninguna alteración fenotípica importante {Okada, 1994 #279} {Wachi, 1997 #278} y no es esencial para la viabilidad de *E. coli*.

Análisis del transcriptoma de *E. coli* utilizando la tecnología microarrays ha revelado que la inactivación de la RNasa G provoca un incremento de los niveles de al menos 11 mRNAs {Lee, 2002 #64}. En contraste, la inactivación de la RNasa E afecta a la mayoría de los transcritos en *E. coli* (Ow y Kushner, resultados sin publicar). En cepas deficientes de la RNasa G, se observa una mayor estabilidad de los mRNAs de *adhE* y *eno*; además, los productos proteicos de estos transcritos, alcohol deshidrogenasa y enolasa, respectivamente, se acumulan en el mutante {Kaga, 2002 #271} {Umitsuki, 2001 #275}. La degradación normal de los mRNAs de *adhE* y *eno* por la RNasa G requiere de la estimulación proporcionada por la interacción con un grupo monofosfato en el extremo 5' de los respectivos mRNAs. Consistente con esta observación, los transcritos de *adhE* y *eno* acumulados en la ausencia de la RNasa G presentan un extremo 5' monofosforilado (Kime y McDowall, datos sin publicar). El origen del grupo 5' monofosforilados del mRNA del *adhE* es un corte por la RNasa III en la región 5' UTR del transcrito nascente {Aristarkhov, 1996 #44}, mientras para *eno*, parece ser un corte de la RNasa E dentro de la región intercistronica compartida con el cistron *pyrC* {Kime, 2008 #247}. La acción endorribonucleolítica de la RNasa G sobre especies intermediarias de RNA generadas por la acción de la RNasa E también han sido observadas para el transcrito *rnr* {Cairrao, 2006 #668} el cual codifica para la RNasa R {Vincent, 2006 #161} {Chen, 2005 #163}. Por tanto, ha sido sugerido que la RNasa G actúa principalmente sobre especies intermediarias de RNA generadas por otras endorribonucleasas {Lee, 2002 #64}.

Una tercera parte de todos los mRNAs identificados como sustratos de la RNasa G {Lee, 2002 #64}, presentan una mayor estabilidad cuando se produce la inactivación del gen que codifica para la RppH pirofosfohidrolasa {Deana, 2008 #33}. Una característica común de todos estos genes cuya estabilidad aumenta, es que están localizados justo corriente abajo del extremo 5' del transcrito primario policistrónico {Gama-Castro, 2008 #670}. Este efecto parece indicar que la generación de los extremos 5' monofosfato por la RppH pirofosfohidrolasa estimula la acción de la RNasa G sobre los transcritos nacientes. No se sabe exactamente la posición en la cual la RNasa G corta ninguno de sus mRNAs sustratos. Sin embargo, si se sabe que la fusión de la región 5'-UTR del mRNA de *adhE* con el mRNA de *lacZ* resulta en la degradación dependiente de la RNasa G de dicho transcrito quimérico {Umitsuki, 2001 #275}.

De todos los genes cuyos mRNA aumentan sus niveles como consecuencia de la inactividad de la RNasa G, muchos de ellos están asociados a proteínas implicadas en el metabolismo de la glucosa (*adhE*, *pgi*, *glk*, *nagB*, *acs*, *eno*, *tpiA*) {Lee, 2002 #64}. Además, se ha observado en mutantes de la RNasa G incrementos de los niveles normales de ácido pirúvico {Sakai, 2007 #266}. Estos resultados proponen a la RNasa G, como un regulador del metabolismo central. La incorporación de la enolasa en el degradosoma {Py, 1996 #483} {Miczak, 1996 #361} y el descubrimiento del requerimiento de esta para la normal degradación del mRNA que codifica el transportador de glucosa en respuesta a estrés de fosfoazúcares {Morita, 2004 #671}, sugieren una íntima conexión entre la degradación del RNA y el metabolismo central.

Actualmente existe un enorme conflicto en relación a los distintos resultados obtenidos por diversos grupos en cuanto a la capacidad de la RNasa G para complementar mutantes de la RNasa E {Lee, 2002 #64} {Ow, 2003 #27}. Análisis genético ha demostrado que la RNasa G es capaz de sustituir el papel funcional de la RNasa E en el procesamiento del 9S rRNA y en la degradación de una variedad de mRNAs, pero no puede suplirla en el procesamiento del tRNA {Ow, 2003 #27}. Interesantemente, mientras la sobreproducción de la forma nativa de la RNasa G en el mutante termo sensible *rne-1* no complementa la inviabilidad asociada con este alelo, la degradación de específicos mRNAs y el procesamiento del 9S rRNA mejoran significativamente. En contraste, el procesamiento de los tRNAs y del M1 RNA de la

RNasa P, no sufren ningún tipo de alteración. Por tanto, la incapacidad de la RNasa G para complementar la mutación del alelo *rne*, incluso cuando se sobreexpresa, podría deberse a la incapacidad de la RNasa G para sustituir la RNasa E en la maduración de los tRNAs {Ow, 2003 #27}. Además, la mitad N-terminal endorribonucleolítica de la RNasa E está conservada evolutivamente en *Synechocystis sp.* y otras bacterias, pero no la mitad C-terminal, la cual es responsable del ensamblaje del degradosoma {Kaberdin, 1998 #360}. Teniendo en cuenta todas estas observaciones, podemos considerar a la RNasa G como un prototipo de endorribonucleasa a partir de la cual la RNasa E ha evolucionado por adquisición de su dominio C-terminal para realizar funciones más especializadas.

4.1.2.2.4 RNasa E

En 1978 Apirion y Lassar, aíslan y analizan un mutante termosensible denominado *rne-3071* {Apirion, 1978 #152}. El análisis de este mutante reveló un defecto en el procesamiento normal del 5S rRNA a la temperatura no permisiva, sugiriendo la existencia de una nueva actividad ribonucleasa en *E. coli*, denominada originalmente ribonucleasa E (RNasa E) y relacionada con el procesamiento del rRNA. Por tanto, el mutante termosensible *rne-3071* mostraba una actividad RNasa E termolábil {Ghora, 1978 #492}. Un año más tarde, Misra y Apirion, purifican por primera vez la RNasa E, y la describen como una enzima implicada en el procesamiento del precursor 9S rRNA para dar lugar a la forma inmadura del 5S rRNA, p5S {Misra, 1979 #149}. Posteriormente, se observó en este mismo mutante una reducción de la tasa de degradación de muchos mRNAs *in vivo* {Mudd, 1990 #486} {Taraseviciene, 1991 #366}. Independientemente, Ono y Kuwano en 1979, identifican otro mutante termosensible, denominado *ams-1* (estabilidad alterada del mRNA), el cual presentaba una acumulación de fragmentos de mRNAs parcialmente degradados {Ono, 1979 #764} y un incremento general de la vida media de los mRNAs celulares {Arraiano, 1988 #31}. Años más tarde se demostró que el alelo *ams-1* codificaba para una proteína con actividad endorribonucleasa {Mackie, 1991 #349}. Más o menos simultáneamente, diversos laboratorios interesados en el estudio de la degradación de mRNA en *E. coli*, demostraron que ambos loci, *asm-1* y *rne-3701*, eran en realidad dos alelos mutantes del mismo locus, denominado *rne* {Babitzke, 1991 #3} {Mudd, 1990 #486}.

{Taraseviciene, 1991 #366} {Melefors, 1991 #768}. Cada uno de estos dos alelos mutantes codificaba una variante de la RNasa E con la substitución de un aminoácido que provocaba la inactivación de la enzima a altas temperaturas {McDowall, 1993 #264} {Cormack, 1993 #346}.

Las primeras evidencias de que la RNasa E pudiera estar implicada en la degradación del mRNA fueron obtenidas mediante estudios con el bacteriófago T4. Usando el mutante termosensible *rne-3071*, fue demostrado que la RNasa E tenía un importante papel en el procesamiento y degradación de los mRNA de bacteriófagos. Análisis posteriores con específicos mRNAs confirmaron la importancia de la RNasa E de *E. coli* y sugirieron que un corte endonucleolítico por la RNasa E es a menudo el evento inicial de la degradación de mRNA en *E. coli*.

El gen *rne* codifica para una endorribonucleasa de 1061 aminoácidos {Cormack, 1993 #346} {Taraseviciene, 1994 #765}. En comparación con otras proteínas codificadas por el genoma de *E. coli*, la RNasa E (número de acceso P21513) es comparativamente grande. Basado en su secuencia y en el análisis de los sitios de inicio de la transcripción, el gen *rne* parece dar lugar a un mRNA monocistrónico. El promotor y el sitio de inicio de la transcripción están localizados a una distancia de 361 nucleótidos corriente arriba del codón de iniciación {Claverie-Martin, 1991 #722}. La extensa región 5'UTR del transcrito *rne* contiene sitios de corte de la RNasa E para llevar a cabo la autorregulación dependiente de la propia RNasa E {Mudd, 1993 #723} {Jain, 1995 #46}. El codón stop en la secuencia de DNA es seguido de una repetición invertida interrumpida y seis residuos de T en la hebra codificante característica del terminador transcripcional ρ -independiente. La longitud del transcrito *rne* es de 3590 bases {Mudd, 1993 #723}. Aunque corta los mRNAs internamente, la RNasa E es una endorribonucleasa 5' dependiente. Su actividad catalítica es estimulada significativamente por su unión al extremo 5' de las moléculas de RNA. Requiere al menos cuatro nucleótidos desapareados en el extremo 5' del RNA para unirse eficientemente y tiene una significativa preferencia por los extremos 5' monofosforilados sobre los 5' trifosfatos de los transcritos primarios {Spickler, 2001 #333} {Tock, 2000 #257}.

4.1.2.2.4.1 Organización del dominio funcional catalítico de la RNasa E.

La estructura cristalina del dominio catalítico de la RNasa E {Callaghan, 2005 #250}, correspondiente a los residuos 1-529, es mostrada en la figura 1.13. El dominio catalítico puede ser dividido en subdominios individuales que presentan plegamientos globulares similares a los de la RNasa H, DNasa I y al dominio de unión de la proteína ribosomal RNA S1 {Bycroft, 1997 #664}. El dominio S1 fue identificado a partir de la similitud de secuencia con otros miembros de la familia. Es de destacar que un plegamiento similar al S1 es encontrado en la PNPasa {Symmons, 2000 #766}. En contraste, los subdominios RNasa H y DNasa I poseen una alta divergencia de secuencia con otros miembros de sus respectivas familias estructurales y sus plegamientos no fueron predichos hasta la determinación de la estructura cristalina. Otro subdominio, denominado sensor 5' por su papel en el reconocimiento del extremo 5' de los RNA, presenta una mezcla de pliegues α y β los cuales forman, en la RNasa E, una estructura unitaria con el dominio S1. El dominio S1 y el sensor 5' se mueven juntos como una unidad para acomodar el sustrato. El último dominio, denominado dominio pequeño, forma las interfaces protomero-protomero.

4.1.2.2.4.2 Dominio C-terminal

La región C-terminal o región no catalítica de la RNasa E, comprende los últimos 550 aminoácidos de la proteína y la predicción bioinformática de la estructura de todas las proteínas del genoma de *E. coli*, ha establecido que la región C-terminal de la RNasa E es una de las regiones no estructurada de mayor longitud en *E. coli*. Comparables regiones no catalíticas son conservadas en casi todas las homólogas en *Proteobacteria* {Marcaida, 2006 #286}. Por tanto, la conservación de la secuencia, la transcripción y la traducción de esta larga región deben de representar una carga en procariotas, por lo que es probable que tenga algún papel beneficioso para que haya sido mantenida en la evolución. Esta región proporciona los principales sitios de interacción proteína-proteína del degradosoma {Vanzo, 1998 #480} {Kaberdin, 1998 #360}, funcionando como una región de andamiaje. Mediante dicroísmo circular y análisis de la estructura cristalina de la región no catalítica recombinante aislada, ha sido corroborado que esta región

presenta en general una conformación extendida con escasa estructura secundaria {Callaghan, 2004 #289}. Es posible que la región no-catalítica adquiera estructura secundaria o una conformación compacta después de asociarse con otros componentes del degradosoma.

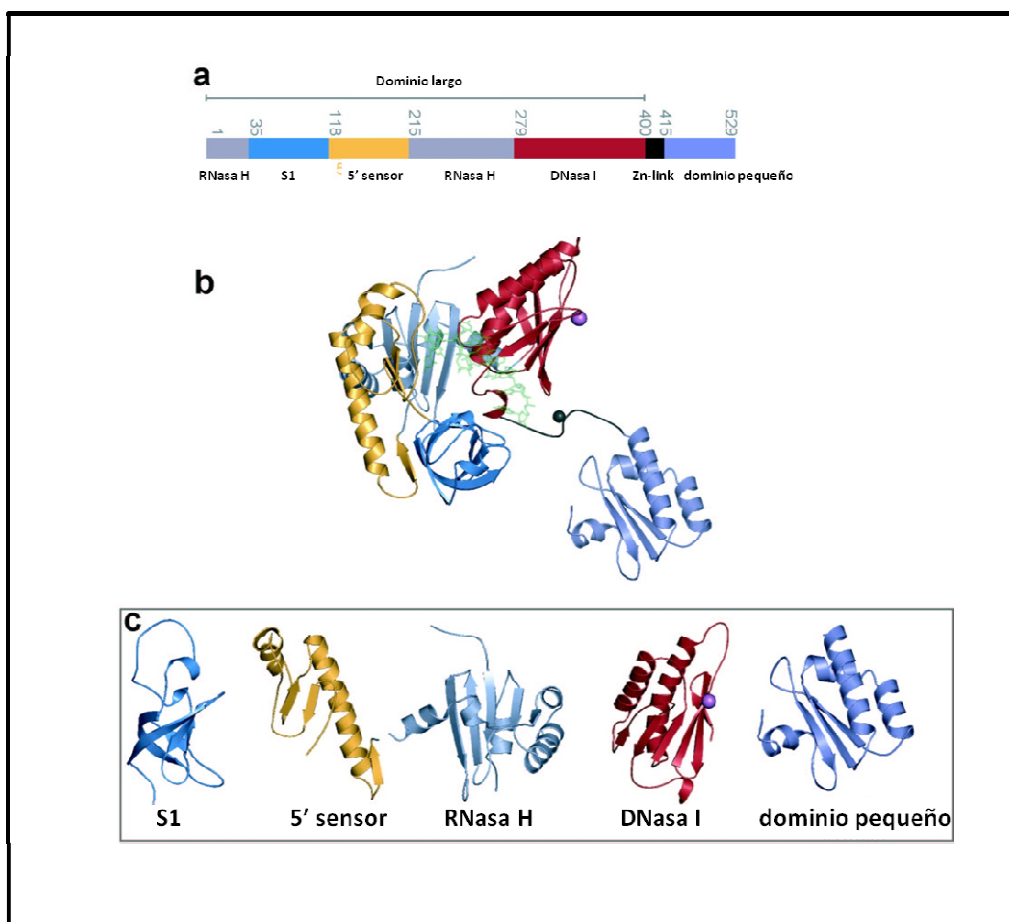


Figura 1.13. Estructural composición del dominio catalítico de la RNase E. (a) Representación lineal de los subdominios. (b) Representación del protomero de la RNase E y (c) representación de sus subdominios.

La región no catalítica está interrumpida por varios segmentos pequeños de secuencias conservadas entre las *Enterobacteria*. Cinco segmentos han sido identificados y la predicción de la estructura de dichas secuencias ha propuesto la posibilidad de formar estructuras secundarias {Callaghan, 2004 #289}. El segmento de anclaje a la membrana está compuesto por varias α -hélices anfipáticas que pueden asociarse con la membrana y localizar el degradosoma en la membrana interna citoplasmática {Khemic, 2008 #283}. El siguiente, el segmento de espiral enrollada puede unirse al RNA, pero no está plegado de forma estable cuando es aislado.

Corriente abajo de este segmento existe un segmento conservado de 69 aminoácidos que forma el sitio de interacción con la RNA helicasa RhlB {Chandran, 2007 #285} {Worrall, 2008 #767}. El segmento de interacción a la enolasa comprende los residuos 839-850 {Chandran, 2006 #742} mientras que el último segmento, el segmento de interacción con la PNPasa, comprende los residuos 1021-1061 {Callaghan, 2004 #289}.

4.1.2.2.4.3 Degradosoma.

Varias evidencias experimentales han puesto de manifiesto que la RNasa E se encuentra en la célula formando parte de un complejo multienzimático denominado degradosoma {Carpousis, 2007 #284} {Py, 1996 #483} {Miczak, 1996 #361}. Este complejo multiproteico fue descubierto en el año 1994 en dos laboratorios diferentes trabajando en la purificación y caracterización de la RNasa E, y en la identificación de factores que afectan la actividad de la PNPasa {Ehretsmann, 1992 #305}{Carpousis, 1994 #303} {Py, 1994 #743}. Los principales componentes del degradosoma son: RNasa E, PNPasa, RNA helicasa RhlB y la enzima glicolítica enolasa {Py, 1996 #483} {Miczak, 1996 #361}. Esta física interacción sugiere que la RNasa E, PNPasa y la RNA helicasa RhlB cooperan en la degradación del mRNA. Con el descubrimiento del degradosoma muchos investigadores asumieron que este complejo era el responsable de la degradación de la mayor parte de los mRNAs {Barlow, 1998 #768} {Rauhut, 1999 #769}. Esta hipótesis fue apoyada por experimentos *in vitro*, que demostraban la degradación del transcrito *rpsT* en un modo comparable al observado *in vivo* {Coburn, 1998 #339}. Además, varios trabajos sugieren que la composición del degradosoma puede variar dependiendo de las condiciones de stress {Khemici, 2004 #290} {Prud'homme-Genereux, 2004 #328} {Gao, 2006 #56} {Morita, 2005 #741}.

Una importante cuestión sobre el degradosoma es saber si existe *in vivo* y si es esencial o no para la degradación. Un trabajo empleando técnicas de inmunolocalización ha sugerido que el degradosoma existe *in vivo* y está localizado en la membrana interna {Liou, 2001 #68}. Sin embargo, ya que *E. coli* es demasiado pequeña, las técnicas de inmunolocalización no pueden demostrar inequívocamente que estas cuatro proteínas colocalizan dentro de la célula. Experimentos utilizando una serie de diferentes mutantes truncados de la RNasa E, que producían RNasa E truncada en su

extremo C-terminal, eran defectivos en el ensamblamiento del degradosoma. Fue demostrado que la vida media de diversos mRNAs diferentes no era significativamente afectada en la ausencia del ensamblaje del degradosoma {Ow, 2000 #4}. Por tanto, parece que la incapacidad para ensamblar el degradosoma en *E. coli* no es esencial para la degradación del mRNA en condiciones normales. Otro dato relacionado con el significado biológico del degradosoma fue la inicial observación de la no existencia de dicho complejo en un largo número de bacterias. En particular, Kaberdin y colaboradores {Kaberdin, 1998 #360} demostraron en una variedad de bacterias, incluyendo *Haemophilus influenzae*, *Synechocystis sp.*, *Porphyra purpurea* y *Mycobacterium tuberculosis*, que todas ellas poseen proteínas homólogas a la RNasa E. Sin embargo, en estas bacterias la similitudes fueron limitadas solamente a los primeros 500 aminoácidos del extremo N-terminal de la RNasa E, es decir, la porción que contiene la región catalítica, mientras que carecen de la región C-terminal de la RNasa E de *E. coli*, necesaria para el ensamblaje del degradosoma. De hecho, las proteínas de *Synechocystis sp.* y *Porphyra purpureas* son menores de 700 aminoácidos de longitud. Aunque estas conclusiones estaban basadas en un número limitado de genomas bacterianos, ahora que ya conocemos el genoma de más de 160 bacterias, una ligera diferencia sobre esta historia ha emergido. La original observación de que la más importante homología de secuencia existe en la porción N-terminal de varias RNasa E homólogas es todavía correcta. En efecto, proteínas con una identidad superior al 50% sobre los 500 primeros aminoácidos varían en longitud desde 1221 (*Yersina pestis*) hasta 642 (*Burkholderia fungorum*) aminoácidos. Por otro lado, búsquedas de BLAST usando los aminoácidos comprendidos entre el 734 hasta el 1061 (región de andamiaje del degradosoma) de la RNasa E de *E. coli* poseen escasa homología. A parte de ciertas especies de *Shigella* y *Salmonella*, las cuales muestran extensa homología, los siguientes mejores alineamientos (*Vibrio*, *Pasteurella* y *Haemophilus*) muestran identidades de secuencias de aminoácidos inferiores al 30%. Por tanto, la región de andamiaje del degradosoma, basada en la secuencia de aminoácidos de *E. coli*, no es altamente conservada. El degradosoma solamente ha sido caracterizado en unos pocos miembros de Proteobacteria y los resultados sugieren que su composición es variable. *Rhodobacter capsulatus* (α -Proteobacteria) tiene un complejo formado por RNasa E,

RNasa R y dos proteínas con cajas DEAD; *Pseudomonas syringae* (γ -Proteobacteria) tiene un complejo formado por RNasa E, una proteína con caja DEAD y el factor de transcripción Rho {Jager, 2001 #770} {Purusharth, 2005 #771}. Esta plasticidad en composición está relacionada con la variabilidad de la secuencia del dominio C-terminal de la RNasa E. Por tanto, parece que la región de anclaje para otras proteínas presente en la RNasa E de *E. coli*, está ausente en la mayoría de los organismos y si está presente debe de tener una secuencia primaria significativamente diferente.

4.1.2.2.4.4 Efecto del extremo 5' de los RNA en la actividad de la RNasa E.

La RNasa E tiene una excepcional especificidad por el sustrato para ser una endorribonucleasa, ya que preferentemente corta RNAs con varios nucleótidos desapareados en el extremo 5'. Estudios bioquímicos han demostrado que el extremo 5' del RNA sustrato tiene un fuerte efecto en la actividad nucleasa de la RNasa E y RNasa G {Mackie, 1998 #338} {Tock, 2000 #257} {Jiang, 2000 #41} {Spickler, 2001 #333}. En diferentes líneas de investigación, se observó que el corte realizado por la RNasa E sobre sus sustratos naturales, tales como el mRNA de *rpsT*, es potenciado *in vitro* por la presencia de un extremo 5' monofosfato. Sustratos con la misma secuencia, pero con un grupo hidroxilo o trifosfato en el extremo 5' del transcrito fueron cortados de forma menos eficiente {Feng, 2002 #62} {Jiang, 2004 #35} {Mackie, 1998 #338} {Walsh, 2001 #255}. Adicionalmente, fue demostrado que la hibridación de un oligonucleótido de DNA complementario al extremo 5' inhibía la actividad de la RNasa E incluso aunque el extremo 5' fuera monofosforilado. Esto indica que el extremo 5' en forma de cadena sencilla de los sustratos de RNA de la RNasa E, es un requisito para el reconocimiento del grupo 5' monofosfato {Mackie, 1998 #338}. La importancia del acceso del extremo 5' *in vivo* fue demostrada por el sustancial incremento de estabilidad conferido al mRNA de *rpsT* cuando este es circularizado {Mackie, 1998 #338} {Mackie, 2000 #334}. En estos experimentos, la única diferencia entre el sustrato lineal y circular era el extremo 5' trifosfato y 3' hidroxilo (en el sustrato lineal) contra el enlace covalente del extremo 5' con el 3' por un enlace fosfodiéster (en el sustrato circular).

Estudios de estructura cristalina mediante rayos X del dominio catalítico de la RNasa E de *E. coli* asociado a un oligoribonucleotido sustrato ha confirmado la existencia de un bolsillo que se une al grupo 5' monofosfato. Los residuos que contactan con el

grupo 5' monofosfato están conservados en la RNasa G de *E. coli* y otras homólogas {Callaghan, 2005 #250}. Hasta ahora todas las endorribonucleasas homólogas a la RNasa E que han sido testadas son capaces de estimularse por la presencia de un 5' monofosfato en el RNA sustrato {Jiang, 2004 #35} {Zeller, 2007 #357} {Kaberdin, 2005 #691} {Tock, 2000 #257}. El reciente descubrimiento de una nueva enzima en *E. coli* denominada RppH, con actividad RNA 5'-pirofosfatasa, capaz de cortar el enlace fosfoanhídrido α - β y convertir el grupo trifosfato de los extremos 5' de los mRNAs en monofosfato {Deana, 2008 #33} {Celesnik, 2007 #34} mediante un proceso similar al decapping en los mRNAs de eucariotas, hace posible pensar en la conversión *in vivo* de los extremos 5' trifosfato de los mRNAs en monofosfato. Estructuras tipo tallo-lazo en el extremo 5' del RNA impiden el acceso de la RppH, lo cual reduce la eficiencia de conversión de los extremos 5' trifosfato en monofosfato {Deana, 2008 #33} {Celesnik, 2007 #34} y estéricamente bloquean la interacción entre el extremo 5' del RNA con el bolsillo de unión al 5' monofosfato de la RNasa E {Callaghan, 2005 #250}. Esto explicaría por qué ciertos mRNAs tales como el *ompA* con una estructura tipo tallo lazo en la región 5'-UTR pueden ser más estables *in vivo* {Emory, 1992 #692} {Bouvet, 1992 #48}. Por ello, se ha sugerido que el estado de fosforilación y la estructura del extremo 5' definen la sensibilidad a la degradación del mRNA en bacterias {Schoenberg, 2007 #690}.

4.1.2.2.4.5 Activación catalítica:

La estructura cristalina del dominio catalítico de la RNasa E, unido a un sustrato de RNA con un grupo monofosfato en el extremo 5' revela que el extremo 5' del sustrato está unido a un bolsillo dentro de un subdominio 5' sensor, que comprende los aminoácidos 118-215. El grupo 5' monofosfato encaja en un anillo semicircular mediante interacciones de puentes de hidrógeno con el grupo OH y la amida del T170 y el grupo guanidino de R169 (Fig. 1.14). Está claro que un sustrato con un grupo 5'-OH no puede formar este tipo de interacciones mientras que un grupo trifosfato puede ser estéricamente ocluido del sitio de unión al extremo 5'. La substitución de los residuos que contactan con el grupo fosfato resulta en una reducción de la tasa de corte de un sustrato con 5' monofosfato similar a la que ocurre con un sustrato 5'-OH {Callaghan,

2005 #250}. Mientras que los datos cristalográficos explican el reconocimiento del extremo 5', ellos no explican cómo la catálisis es estimulada por el reconocimiento del grupo monofosfato terminal del extremo 5'.

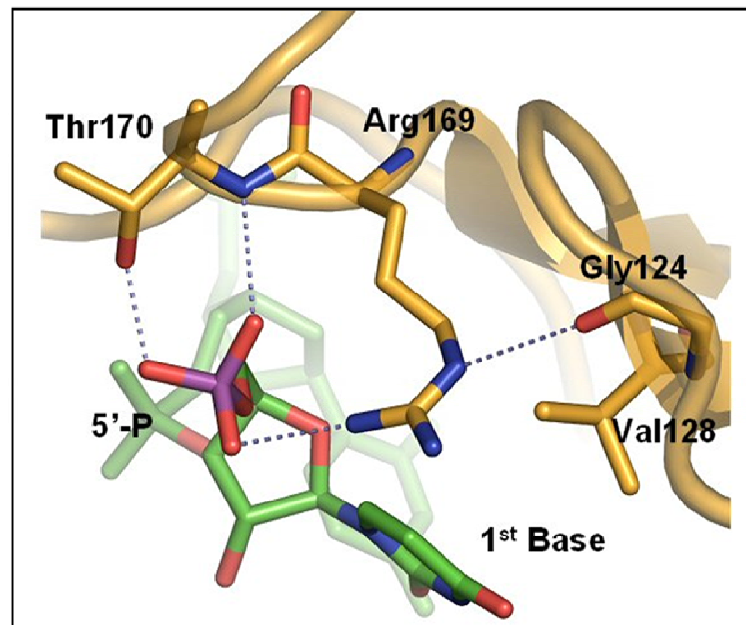


Figura 1.14 Interacción del grupo 5' fosfato con el subdominio 5' sensor. El grupo 5' monofosfato (violeta) del extremo de un RNA sustrato (verde) encaja en un anillo semicircular en el 5'sensor mediante interacciones de puentes de hidrógeno con el grupo OH y la amida del T170 y el grupo guanidino de R169

Ha sido propuesto que el encaje del grupo monofosfato en el bolsillo de unión dispara un cambio conformacional que voltea el dominio S1 hacia abajo colocando el RNA en el centro activo. Este cambio estructural genera una hendidura para la unión del RNA de cadena sencilla, organiza el sitio catalítico y expone los enlaces fosfodiéster en una geometría óptima que favorecen el corte. Mientras los datos estructurales apoyan la hipótesis del cambio de activación, hasta ahora no sabemos cómo los extremos 5' de los sustratos de RNA provocan este cambio conformacional y cómo este reconocimiento estimula el poder catalítico de la enzima. Datos bioquímicos indican que la unión del grupo 5' monofosfato al bolsillo de unión por sí misma no es suficiente para inducir un cambio conformacional si no que simplemente favorezcan la unión del sustrato.

Estudios con la RNasa G han confirmado que la interacción con el grupo 5' monofosfato contribuye a la afinidad global de la unión {Jourdan, 2008 #249}. Por tanto, la dependencia por el extremo 5' se puede deber a una mayor afinidad por los

sustratos 5' monofosfato, de tal modo que la unión del RNA a la RNasa E incrementa la concentración local y el desplazamiento del equilibrio desde la forma abierta a la cerrada se ve favorecido cuando el RNA es acomodado dentro de la hendidura y por consiguiente estabiliza la formación de la hendidura. Entonces, un sustrato con un grupo 5' hidroxilo se unirá y será cortado, pero no tan frecuentemente como un sustrato con un grupo 5' fosfato mientras que un sustrato con un extremo 5' trifosfato impedirá estéricamente la estructural transición requerida para el corte. El amplio movimiento realizado por los brazos formados por la unión del dominio sensor 5' y el dominio S1 puede ayudar a capturar RNA. La estructura cristalina del complejo RNasa E y un pequeño RNA revela que el RNA está unido a la superficie del dominio S1. Entonces, el dominio S1 en la forma tetramérica de la RNasa E podría unirse a diferentes sitios de un mRNA para mantener el sustrato en la proximidad del sitio de corte.

4.1.2.2.4.6 Especificidad del sitio de corte de la RNasa E.

La especificidad de la RNasa E ha sido extensivamente estudiada. Sin embargo, el sitio específico de corte de la RNasa E no ha sido determinado. Iniciales trabajos de Tomcsányi y Apirion, identificaron una secuencia consenso de reconocimiento para la RNasa E formada por 10 nucleótidos {Tomcsanyi, 1985 #109}. Posteriormente, la secuencia consenso RAUUW (R=G o A; W=U o A) fue propuesta por Ehretsmann *et al.* {Ehretsmann, 1992 #305}. Varios trabajos demostraron de manera convincente que la actividad de la RNasa E es dependiente de RNA de cadena sencilla y carece de secuencia estricta de reconocimiento {Cormack, 1992 #347}{Mackie, 1992 #348}{McDowall, 1994 #263} {Mackie, 1993 #344}. {Lin-Chao, 1994 #262} La RNasa E corta preferentemente en el extremo 5' del dinucleótido AU dentro de secuencias ricas en AU {McDowall, 1994 #263}. El papel de las estructuras secundarias adyacentes al sitio de corte ha sido ampliamente estudiado. La mayoría de los sitios de corte son precedidos o seguidos por una estructura estable tallo-lazo. Por ello, se ha sugerido que la presencia de una estructura tallo-lazo estable en el extremo 3' al sitio de corte es importante en la definición de un sitio sensible a la acción de la RNasa E {McDowall, 1994 #263}. Se piensa que estas estructuras tipo tallo-lazo no funcionan directamente como dominios de reconocimiento sino que sirven para estabilizar estructuras secundarias locales

de forma que el sitio adyacente de corte permanezca en una configuración de cadena sencilla óptima para la acción de la RNasa E. Por el contrario, estudios realizados con oligonucleótidos sintéticos {McDowall, 1995 #261} y complejos RNAs como sustratos {Mackie, 1993 #344} sugieren que adyacentes estructuras secundarias al sitio de corte reducen la eficiencia de corte y podrían, por tanto, modular la actividad de la RNasa E. Esto podría ser debido a un efecto estérico de forma que la estructuras tallo-lazo impidieran el libre acceso de la RNasa E al sitio de corte. Además, estructuras tallo-lazo adyacentes al sitio de corte podrían promover enrollamientos helicoidales de los residuos del sitio corte inhibiendo por tanto el ataque enzimático.

4.1.2.2.4.7 La regulación de la síntesis de la RNasa E.

La expresión de la RNasa E es autorregulada mediante la interacción de la RNasa E con los 361 nucleótidos del extremo 5' UTR del transcrito *rne* y posterior corte endorribonucleolítico específico a 49-50 nucleótidos corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción {Jain, 1995 #46} {Diwa, 2002 #39}{Diwa, 2000 #40}. Esta región 5'-UTR (Fig. 1.15) forma múltiples estructuras secundarias, la más importante de las cuales es la segunda estructura tipo tallo-lazo (hp2), la cual controla la tasa de degradación del mRNA en función de los niveles de actividad de la RNasa E en la célula (Diwa et al., 2000). Este stem-loop es el lugar de unión de la RNasa E a su transcrito y contiene 57 nucleótidos {Diwa, 2002 #39}. Para llevar acabo la autorregulación, la RNasa E no corta el segundo stem-loop, ya que esta tiene una predominante estructura bicatenaria {Diwa, 2000 #40}. La RNasa E usa esta estructura como punto de anclaje a su propio transcrito en una apropiada posición para realizar el corte en otra región de cadena sencilla. Esto permite a la RNasa E superar obstáculos, tales como la unión de ribosomas u otras estructuras secundarias en el transcrito, los cuales pueden impedir el acceso de la RNasa E a su sitio de corte específico {Diwa, 2000 #40}. Similares estructuras stem-loop son específicas de ciertos RNAs que son sustratos de la RNasa E {Taraseviciene, 1995 #667}.

Este corte endorribonucleolítico de la RNasa E acelera la degradación del transcrito *rne* y mantiene los niveles intracelulares de la RNasa E dentro de sus límites fisiológicos. Por tanto, la RNasa E controla su propia síntesis por cambios de la

estabilidad de su propio transcrito. Cuando la cantidad de enzima se incrementa , la actividad de la misma también, esto tiene como resultado una aceleración de la tasa de degradación del transcrito {Jain, 1995 #46}. En el mutante termosensible *rne-1*, el *rne* transcrito es mucho más estable a la temperatura no permisiva, causando un incremento de hasta 10 veces de la cantidad del transcrito de 3.6 kb de longitud y consecuentemente una desregulación de los niveles de la enzima {Henry, 1992 #29} {Jain, 1995 #46}. Este incremento en la estabilidad es debido a que en el mutante *rne-1* la RNasa E es defectiva en la degradación de su propio transcrito {Ow, 2000 #4}. Esto último conduce a un incremento de la síntesis de la enzima {Ow, 2000 #4} {Mudd, 1993 #723}. Sin embargo, a pesar de este incremento de la concentración de la RNasa E, la actividad total de la enzima esta reducida , ya que este mutante produce una RNasa E de reducida activida catalítica {Jain, 1995 #46}.

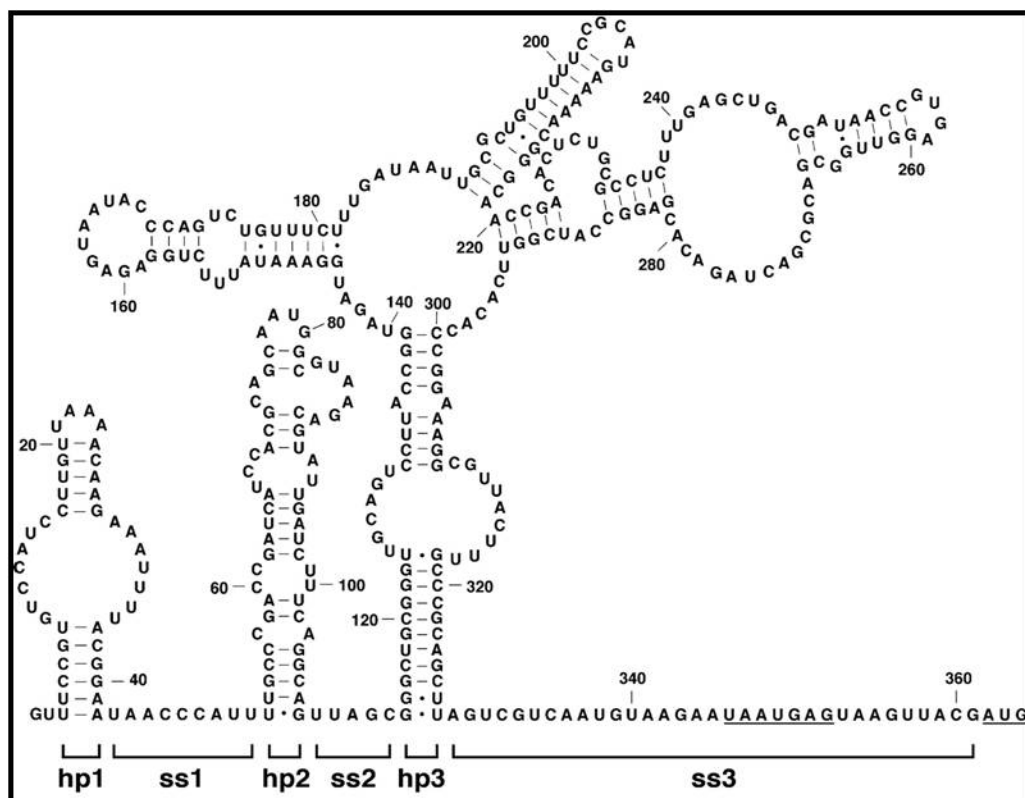


Figura 1.15. Estructura de la región 5'UTR del transcrito de la RNasa E. Los corchetes delimitan los dominios estructurales descritos. El elemento Shine-Delgano y el codón de iniciación están subrayados.

4.1.2.2.4.8 Actividad RNasa E en células humanas.

La proteína ARD-1 (activador de la degradación del RNA) de 13.3 kDa fue inicialmente identificada como el producto expresado a partir de un cDNA derivado de linfocitos B humanos transformados por el virus de Epstein Barr {Wang, 1994 #81}. La ARD-1 es una endorribonucleasa capaz de complementar y revertir los efectos pleiotrópicos en mutantes de la RNasa E de *E. coli* {Wang, 1994 #81}. Esta endorribonucleasa humana presenta actividad tipo RNasa E y es específica del sitio de corte {Claverie-Martin, 1997 #75}. Se une a los mismos sustratos y corta en los mismos sitios que la RNase E {Claverie-Martin, 1997 #75; Wang, 1994 #81}. Es dependiente de Mg^{+2} y de RNA de cadena sencilla, generando extremos 5' monofosfatos en el sitio de corte {Claverie-Martin, 1997 #75}. Curiosamente, la proteína ARD-1 humana es codificada por el mismo gen que codifica para otra proteína NIPP-1 (inhibidor nuclear de la fosfatasa 1) {Van Eynde, 1995 #555} {Jagiello, 1997 #556}{Jagiello, 1995 #557}{Trinkle-Mulcahy, 1999 #72} y los mRNAs maduros de estas dos proteínas son generados mediante splicing alternativo del mismo precursor primario de mRNA {Chang, 1999 #69}. Por tanto, ambas proteínas ARD-1 y NIPP-1 son isoformas del mismo loci con funciones totalmente diferentes {Smith, 1989 #559}. La ARD-1 es una proteína rica en prolinas conteniendo un motivo de reconocimiento de RNA comprendido entre los aminoácidos 15-38, seguido por una región rica en glicina y una región C-terminal muy básica rica en lisina. Las regiones ricas en residuos de prolina, al igual que la RNasa E {Coburn, 1999 #337}, pueden contribuir a su anómala migración en geles de acrilamida {Van Eynde, 1995 #555; Wang, 1994 #81}. El transcrito *ard-1* maduro posee un intrón retenido en el extremo 5' con múltiples codones stop de traducción {Chang, 1999 #69} que pueden contribuir a una terminación prematura de traducción y a iniciar la denominada ruta de degradación de RNA sinsentido {Maquat, 1995 #563}{Hentze, 1999 #564}, limitando así la producción celular de la proteína ARD-1. Ha sido observado mediante análisis de Northern Blotting que en condiciones normales los niveles del transcrito *ARD-1* son al menos 20 veces inferiores que los niveles de *NIPP-1*{Chang, 1999 #69}.

La proteína ARD-1 comparte características comunes con proteínas que están implicadas en el splicing (por ejemplo, ASF/SF2, 9G8 y 70K), incluyendo una región de

unión al RNA en el extremo N-terminal y una región altamente cargada en el extremo C-terminal {Ge, 1991 #560}{Golovkin, 1996 #561}. Mediante análisis de comparación de secuencias se ha observado que la ARD-1 y la RNasa E contienen regiones que se asemejan como el altamente conservado componente de unión al RNA, la proteína 70K, del pequeño complejo ribonucleoproteico U1 implicado en el splicing de los mRNAs en eucariota. Además, la ARD-1 posee similitud con segmentos de proteínas del citoesqueleto implicadas en la regulación del ensamblaje y transporte de complejos RNA/proteínas {Wang, 1994 #81}.

4.1.2.2.4.9 Moduladores y adaptadores de la actividad de la RNasa E.

4.1.2.2.4.9.1 Inhibidores de la RNasa E.

Mediante screening genético han sido identificadas dos proteínas inhibidoras de la RNasa E, denominadas RraA (regulador de la actividad de la ribonucleasa A) y RraB {Lee, 2003 #60}. Estas proteínas interactúan físicamente con la región no catalítica de la RNasa E inhibiendo su actividad catalítica, tanto *in vitro* como *in vivo*. Intentos experimentales para localizar el sitio exacto de unión de la RraA a la RNasa E han concluido sin éxito, lo cual sugiere que este inhibidor puede reconocer múltiples sitios en la región no catalítica. Por el contrario, ha sido demostrado que la RraB interactúa con la RNasa E en el sitio de unión de la RNA helicasa RhlB. La elevada expresión *in vivo* de RraA o RraB tiene diferentes efectos sobre los niveles de ciertos transcritos y en la composición del degradosoma {Gao, 2006 #56}. Ambos inhibidores reducen significativamente la cantidad de PNPasa en el degradosoma. Además, la sobreexpresión de RraA reduce significativamente la cantidad de la RNA helicasa RhlB y enolasa que se unen a la RNasa E, mientras células que sobreexpresan RraB, presentan la RNA helicasa RhlB y una proteína de choque frío, CsdA, unidas a la RNasa E. La CsdA ha sido previamente demostrada estar asociada a la RNasa E solamente bajo condiciones de choque frío {Khemici, 2004 #288} {Prud'homme-Genereux, 2004 #328}. Por tanto, todos estos resultados sugieren que *E. coli*, codifica factores proteicos que pueden afectar la actividad de la RNasa E y modular la composición del degradosoma.

4.1.2.2.4.9.2 Reclutamiento de la RNasa E por Hfq y sRNA.

La proteína Hfq (factor del huésped del bacteriofago Q β) fue inicialmente identificada por su papel en la replicación del bacteriofago Q β {Franze de Fernandez, 1968 #772}. Posteriormente fue demostrado ser una proteína abundante *in vivo*, que parece existir en forma de anillo hexámerico en *E. coli* y *Staphylococcus aureus* {Sauter, 2003 #773} {Schumacher, 2002 #774}. En *E. coli*, se ha observado que Hfq funciona como una proteína de unión al RNA implicada en una variedad de procesos incluyendo el control postranscripcional de la expresión génica por sRNA regulatorios {Gottesman, 2004 #624} {Wagner, 2002 #775} {Carpousis, 2003 #776} {Brennan, 2007 #777}. La proteína se une tanto al DNA como RNA, pero presenta preferencias por las secuencias ricas en AU. Hfq está implicada en el control de los niveles de expresión de una variedad de mRNAs, tales como *rpoS* {Muffler, 1996 #778} y *OmpA* {Vytvytska, 2000 #779}. Su habilidad para unirse a secuencias ricas en AU, algunas de las cuales son sitios de corte de la RNasa E ricas en AU, sugiere un papel de esta proteína en la modulación de la degradación de mRNAs y del procesamiento de tRNAs {Moll, 2003 #780} {Zhang, 2003 #782}. Ha sido demostrado que Hfq interacciona con una variedad de sRNA {Zhang, 2003 #782} {Moller, 2002 #783} {Sledjeski, 2001 #784} {Zhang, 1998 #785}. Dos de estos sRNA implicados en la función de Hfq son: RyhB y SgrS. El mRNA *sodB* diana del RyhB está implicado en el metabolismo del hierro {Masse, 2007 #787} mientras el mRNA *ptsG* diana del sRNA SgrS codifica para un componente esencial del sistema de transporte de fosfoazúcares {Vanderpool, 2004 #786}. La Hfq se une a RyhB y SgrS y los protege de su degradación por la RNasa E mediando su interacción con el mRNA diana {Masse, 2003 #788} {Morita, 2005 #741}. RyhB y SgrS bloquean la iniciación de la traducción por unión a los mRNAs diana. La inhibición de la traducción es acoplada a la degradación de ambos sRNAs y sus mRNAs diana mediada por la RNasa E {Masse, 2003 #788} {Morita, 2005 #741}. La degradación de los mRNAs no traducidos parece ser un segundo evento haciendo irreversible la inhibición de la traducción {Morita, 2006 #789} {Aiba, 2007 #790}. Un complejo RNasa E, Hfq y Sgr es formado bajo condiciones de estrés por acumulación de fosfoazúcares. La formación del complejo RNasa E-Hfq-SgrS requiere la misma región de la RNasa E necesaria para la formación del degradosoma y

existen evidencias que sugieren que el degradosoma es remodelado debido a nuevas interacciones. En cepas expresando variantes de la RNasa E, que carecen de la región necesaria para la interacción con el complejo Hfq-SgrS, la traducción es inhibida pero el mRNA no es degradado. Estos resultados han sido interpretado como una evidencia de que la física interacción de la RNasa E con el complejo Hfq-SgrS es requerido para reclutar la RNasa E al mRNA diana para iniciar su degradación. Por otro lado, ha sido demostrado que Hfq afecta a la poliadenilación del mRNA *rpsO* {Hajnsdorf, 2000 #791} {Le Derout, 2003 #792}. Experimentos *in vitro* han sugerido que Hfq protege el RNA, en particular, a las colas poly(A), de la degradación exorribonucleolítica {Folichon, 2003 #793}. Sin embargo, análisis *in vivo* indican que Hfq sirve para promover poliadenilación en sitios específicos de las moléculas de RNA más que proteger las colas poly(A) de la degradación (Mohanthy y Kushner, datos no publicados).

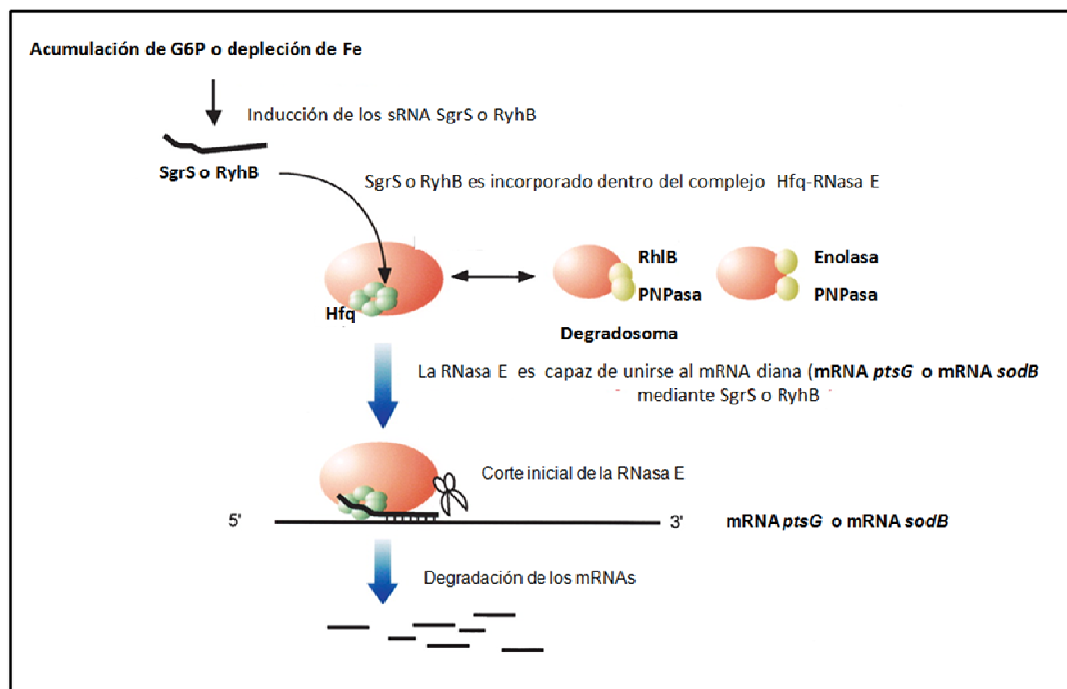


Figura 1.16. Degradación de mRNA mediante complejos RNasa E-Hfq-sRNA. En este ejemplo, un complejo RNasa E, Hfq y SgrS o RyhB es formado bajo condiciones de estrés por acumulación de fosfoazúcares (G6P) o depleción de hierro(Fe). Los complejos RNasa E, Hfq y SgrS o RyhB son capaces de degradar a los mRNA *ptsG* o *sodB* respectivamente.

4.1.2.2.4.10 Otras Proteínas implicadas en la degradación de mRNA.

4.1.2.2.4.10.1 RNA helicasa RhlB.

E. coli posee un largo número de potenciales RNA helicasas, incluyendo al menos 5 miembros de una familia de helicasas caracterizada por la presencia de caja DEAD {Linder, 1989 #694}. Una de estas helicasas, codificada por el gen *rhlB*, {Kalman, 1991 #695} ha sido implicada en la degradación de mRNA debido a que coprecipita con la RNasa E y la PNPasa {Py, 1996 #483}. La RNA helicasa RhlB es ATP-dependiente y posee un peso molecular de 50 kDa. Esta proteína está altamente conservada tanto en Gram-negativos como en Gram-positivos. La carencia de un buen sistema *in vitro* para analizar la actividad de la RNA helicasa RhlB y la aparente letalidad de la mutación anuladora del gen *rhlB* {Kalman, 1991 #695} son severas limitaciones para analizar la función *in vivo* de este componente clave del degradosoma. Aunque no está claro que la proteína aislada tenga actividad helicasa, Coburn y colaboradores {Coburn, 1999 #336} han demostrado que en presencia de RNasa E y ATP, una combinación de PNPasa y RNA helicasa RhlB es suficiente para degradar un producto de degradación de 147 nucleótidos perteneciente al transcrito *rpsT*, que contiene estructuras secundarias estables. Su presencia en el degradosoma es sugerente, como lo es la implicación de la helicasa DBP2 de levaduras en la degradación de mRNAs sin sentido {He, 1995 #696}. Debido a que muchas moléculas de RNA contienen estructuras secundarias que inhiben la acción 3'→5' exonucleasa, la RNA helicasa RhlB podría participar en la degradación del mRNA desplegando estas estructuras secundarias desfavorables para la acción de las 3' exorribonucleasas.

4.1.2.2.4.10.2 Poly(A) polimerasa (PAP I).

La poly(A) polimerasa I (PAP I), codificada por el gen *pcnB*, fue descubierta y purificada en *E. coli* a principios de los 1960s, antes del descubrimiento de la presencia de colas poly(A) en los mRNA de eucariotas {August, 1962 #794}. A pesar de su temprano descubrimiento, la función de la PAP I en *E. coli* ha permanecido obscura a causa de la prevalencia de un dogma que proponía que los mRNAs de bacterias, a diferencia de los mRNAs de eucariotas, no estaban poliadenilados. A pesar de los trabajos publicados sobre RNAs poly(A) o oligoadenilados en bacterias {Srinivasan, 1975

#795} {Gopalakrishna, 1981 #796} la poliadenilación del RNA en bacterias no fue aceptada hasta casi 25 años después del descubrimiento de la PAP I.

La PAP I es un monómero de 56 kDa y requiere Mg^{+2} para su actividad. La PAP I de *E. coli* no muestra similitud con otras poly(A) polimerasas {Cao, 1992 #610} pero muestra significativa similitud a nivel de secuencia y función con la tRNA nucleotidil transferasa (enzima que añade el triplete CCA a los extremos 3' de los tRNAs) {Haugel-Nielsen, 1996 #797} {Masters, 1990 #798}. Añade residuos de adenilato a los extremos 3' de los RNAs usando ATP como donador en ausencia de un molde de DNA. Resultados *in vitro* han demostrado que PAP I puede generar errores, ocasionalmente añadiendo residuos de C, U y G {Yehudai-Resheff, 2000 #417}. Sin embargo, *in vivo*, la enzima parece incorporar solamente residuos de adenina {Mohanty, 2000 #655}. La actividad poly(A) polimerasa también es detectable en cepas con el gen *pcnB* deletado, lo que implica que una segunda poly(A) polimerasa (PAP II) pueda existir en *E. coli* {Kalapos, 1994 #800}. Mutaciones en el gen *pcnB* condujeron a reducir el número de copias de plásmido debido a un aumento de la estabilidad del RNA I, un RNA antisense regulador de la replicación de plásmidos tipo ColE1, {He, 1993 #801} {Masters, 1993 #802}. La adición de colas poly (A) al RNA I estimula su tasa de degradación *in vitro* de 4 a 5 veces disminuyendo el efecto represor de la replicación de los plásmidos tipo ColE1 {Xu, 1995 #803}. Resultados de varios trabajos sugieren que en *E. coli* una fracción de mRNA es poliadenilada como un requisito para su degradación {O'Hara, 1995 #21}{Hajnsdorf, 1994 #728} {O'Hara, 1995 #21} {Hajnsdorf, 1994 #728} {Hajnsdorf, 1995 #804}. Esto podría deberse a que la acción de la PAP I sobre una molécula de RNA generara un extremo 3' no estructurado con poly(A), el cual permitiría el acceso y la unión de las 3' exorribonucleasas a los potenciales sustratos favoreciendo así su degradación {Coburn, 1996 #341} {Coburn, 1996 #342}. Por tanto, las colas poly(A) de eucariotas y procariotas parecen tener funciones diferentes. Las colas poly(A) en bacterias podrían servir para marcar los fragmentos de mRNA que van a ser degradados, de un modo similar a la etiquetación de ciertas proteínas por ubiquitina para su degradación {Ciechanover, 1994 #806}.

Debido a que los niveles de poliadenilación en *E. coli* son muy bajos (se estima que entre un 1-2% del RNA total de *E. coli* {Cao, 1992 #611}, {Mohanty, 1999 #658}, no

está claro si otras bacterias son capaces de poliadenilar sus mRNAs. Sin embargo, mRNAs poliadenilados han sido identificados en *S. coelicolor* {Bralley, 2001 #805} y bacterias fotosintéticas {Rott, 2003 #656}, aunque en estas especies las colas poly (A) parecen ser sintetizadas por la PNPasa {Bralley, 2001 #805} {Rott, 2003 #656}.

4.1.2.2.4.10.3 Proteínas de unión a poly(A): S1 y CspE.

Hoy sabemos que en *E. coli* y otros procariotas no existen proteínas homólogas a las proteínas de unión de las colas poly(A) de los mRNA eucariotas. Sin embargo, hay un considerable interés en determinar si hay otras proteínas de función similar. Por ejemplo, el dominio de unión al RNA S1 originalmente asociado con la proteína ribosomal S1 {Bycroft, 1997 #664} ha sido encontrado en una variedad de RNasas, incluyendo RNase E, RNase G, RNase II y PNPasa. Debido a que la PNPasa y la RNasa II prefieren sustratos poly(A), no debería ser sorprendente que la proteína ribosomal S1 también pudiera unirse a las colas poly(A). En efecto, Feng y colaboradores {Feng, 2001 #66} demostraron que *in vitro* la proteína S1 actúa como una proteína de unión a las colas poly(A). Además, ellos también demostraron que la proteína de choque frío CspE era capaz de unirse a las colas poly(A) para inhibir la capacidad de la PNPasa de degradar dichos sustratos {Feng, 2001 #66}.

4.1.2.2.4.10.4 Enolasa.

La enolasa es una enzima glicolítica cuyo papel en la degradación del mRNA sigue siendo un misterio. Esta enzima cataliza la reversible deshidratación del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato. La enolasa es una proteína abundante en *E. coli*, pero sólo una pequeña proporción está unida a la RNasa E como un componente del degradosoma de RNA (Liou, 2002, JBC; {Py, 1996 #483}. Análisis de microarrays sugieren que la enolasa afecta la degradación de ciertos mensajeros que codifican para enzimas implicadas en rutas de generación de energía {Bernstein, 2002 #63} {Bernstein, 2004 #59}, además la enolasa y la RNasa E están implicadas en la respuesta al estrés de fosfoazúcares {Morita, 2004 #671} {Morita, 2005 #741}. Estos resultados han sugerido una serie de hipotéticas funciones para la enolasa en el degradosoma, incluyendo la posibilidad de que actúe como un sensor implicado en el mantenimiento de un balance entre el estado

energético de la célula y la degradación de mRNA. Sin embargo, la importancia fisiológica de esta relación entre el estado energético de la célula con degradación de mRNA así como la base molecular para regular dicho balance no se comprende hoy en día.

4.2 Rutas de degradación del mRNA en *E.coli*.

4.2.1 Degradación del mRNA en *E. coli* en condiciones normales de crecimiento.

Bajo condiciones normales de crecimiento de *E. coli*, se piensa que la principal ruta de degradación de mRNA es iniciada con un corte endonucleolítico mediado principalmente por la RNasa E y, con menor relevancia, por otras endorribonucleasas más especializadas, tales como RNasa G, RNasa III, RNasa P y más recientemente la RNasa Z {Perwez, 2006 #28} seguido de una degradación exorribonucleolítica del RNA. Aunque la RNasa E corta internamente, esta endorribonucleasa es dependiente del extremo 5' del mRNA. La RNasa E requiere al menos cuatro nucleótidos de cadena sencilla en el extremo 5' para ser capaz de unirse eficientemente y presenta una preferencia significativa por los extremos 5' monofosforilados sobre los extremos 5' trifosfato de los transcritos primarios. Se ha propuesto que la pirofosfatasa RppH podría actuar sobre el grupo 5' trifosfato de primer nucleótido del extremo 5' del transcrito primario convirtiéndolo en un extremo 5' monofosfato, un proceso análogo a la eliminación de la caperuza o decapping de los mRNAs eucariotas, lo cual favorecería el corte inicial de la RNasa E.

Los extremos 3' originales de la mayoría de los mRNAs bacterianos están protegidos del ataque de 3'exorribonucleasas por las estructuras secundaria del terminador Rho independiente. Sin embargo, el corte endorribonucleolítico genera un nuevo extremo 3', generalmente, no protegido por estructuras secundarias, que es rápidamente degradado por 3' exorribonucleasas. Las principales exorribonucleasas que actúan en *E. coli* son la RNasa II, PNPasa y la RNasa R. La RNasa II puede degradar solamente RNA de cadena sencilla y es completamente inhibida por estructuras secundarias. La PNPasa y la RNasa R pueden superar las estructuras secundarias, sin embargo, requieren una corta región de cadena sencilla para anclarse al RNA. Esta corta región suele consistir en una cola de poly (A), sintetizada por la PAP I. Mientras que para

la acción de la RNasa R es suficiente una corta región de siete nucleótidos {Vincent, 2006 #161}, debido a su intrínseca habilidad para avanzar a través de estructuras secundarias, la PNPasa puede requerir asistencia de una helicasa para estructuras estables particulares. Por ejemplo, la degradación de los altamente estructurados elementos REP puede estar acompañada por la combinación de la RNasa R y PAP I {Cheng, 2005 #165} o de la PNPasa unida al degradosoma y la RhlB {Khemici, 2004 #290}. Múltiples rondas de poliadenilación y exorribonucleolítica degradación pueden ser requeridas antes de que las estructuras secundarias sean completamente degradadas. La acumulación de fragmentos de corto tamaño, comprendidos entre 2-5 nucleótidos, generados por las RNasa II, RNasa R y PNPasa sirven de sustrato para la oligorribonucleasa, la cual convierte esos oligorribonucleótidos en mononucleótidos.

Resultados de varios laboratorios han proporcionado evidencias de que la degradación del mRNA tiene lugar cerca o en la membrana interna de la célula. Experimentos de localización subcelular realizados por Liou y colaboradores. {Liou, 2001 #68} demostraron que alrededor del 91% de la RNasa E fue observada sobre o dentro de los 100nm de la membrana citoplasmática. Puesto que la RNasa E está probablemente implicada en la degradación de la mayoría de los transcritos de *E. coli*, los pasos iniciales de degradación tendrían lugar cerca o en la membrana citoplasmática.

4.2.3 Degradación del mRNA en condiciones de stress.

Condiciones severas de estrés, tales como una carencia de aminoácidos, pueden conducir a la activación de sistemas toxina-antitoxina en *E. coli*. En cada uno de estos sistemas la toxina y antitoxina son codificadas por el mismo operón. Se sabe que al menos cuatro de estas toxinas, MazF, ChpBK, YoeB y RelE funcionan como endorribonucleasas o facilitadoras de la actividad RNasa. En estos sistemas la antitoxina se une fuertemente a la toxina bloqueando su actividad endorribonucleasa {Gerdes, 2005 #494},{Buts, 2005 #496},{Condon, 2006 #512}. Sin embargo, la antitoxina es mucho más lábil y requiere una síntesis continua para mantener unos niveles capaces de inactivar a la toxina. La toxina funciona como una especie de sensor de la capacidad de traducción de la célula. De tal manera, que un arresto de la traducción conduce a una activación de la actividad endorribonucleasa de la toxina debido a una disminución de la

antitoxina. Las toxinas con actividad RNasa, generalmente reconocen y cortan pequeñas secuencias de cadena sencilla (a menudo tan cortas como tripletes), de modo que la mayoría de los mRNAs celulares se convierten en dianas para su destrucción, este fenómeno ha sido denominado apagado de expresión por degradación de mRNAs (SDD) {Condon, 2006 #512}. MazF, por ejemplo, corta tripletes ACA, mientras EndoA, su homóloga en *Bacillus subtilis*, corta preferencialmente en un contexto (U/A) UAC (U/A) {Pellegrini, 2005 #519}. Actuales modelos sugieren que el SDD funciona como un sistema para hacer borrón y cuenta nueva de los mRNAs transcritos, reprogramando así a los ribosomas para la expresión de los genes necesarios para adaptar a la célula a las nuevas condiciones de crecimiento. Aunque MazF, EndoA, ChpBK y YoeB pueden cortar directamente mRNAs {Pellegrini, 2005 #519}{Kamada, 2005 #540}{Zhang, 2005 #541}, RelE puede funcionar solamente cuando se une al sitio A del ribosoma. Entonces no está claro si la RelE tiene actividad RNasa por si misma o si estimula al ribosoma a cortar el RNA. Sin embargo, la ribonucleasa RegB, codificada por el bacteriófago T4, ha sido recientemente demostrado ser un miembro de la familia de toxinas RelE {Odaert, 2007 #546}. Una característica llamativa de la degradación de mRNAs por toxinas, es que dejan en el extremo 3' del fragmento 5' del RNA, producido por el corte endorribonucleolítico, un grupo fosfato {Pellegrini, 2005 #519}{Zhang, 2005 #544} en vez de un grupo 3' hidroxilo como ocurre con la RNasa E.

5. RNase E implicada en la división celular.

Goldblum y Apirion {Goldblum, 1981 #568} analizando el mutante termosensible *rne-3071*, observaron un incremento lineal de la absorbancia durante las tres horas posteriores de incubar el mutante termosensible *rne-3071* a la temperatura no permisiva, y un incremento lineal similar ocurrió en todos los componentes macromoleculares medidos, incluyendo DNA, RNA, proteínas y lipopolisacaridos {Goldblum, 1981 #568}. Durante este periodo, las células se elongan, pero son incapaces de formar colonias en medio sólido {Apirion, 1978 #152}. Por tanto, estos experimentos sugerían por primera vez, que uno de los efectos tempranos de la inactivación de la RNasa E era el bloqueo de la división celular.

La división celular de *E. coli* requiere los productos de varios genes esenciales.

Los datos obtenidos por diferentes laboratorios indican que el gen *ftsZ* (filamentación sensible a la temperatura Z), el cual es altamente conservado entre procariotas y cloroplastos de plantas, tiene un papel central en el proceso de división {Goehring, 2005 #698}{Margolin, 2005 #699}{Romberg, 2003 #700} {Lutkenhaus, 1993 #708}. Corriente arriba del gen *ftsZ* existen dos genes implicados también en la división celular, *ftsA* y *ftsQ*. Durante la división celular, la proteína FtsZ, la cual es una GTPasa y estructuralmente homóloga a la tubulina, polimeriza y forma una plataforma para el andamiaje de otras proteínas en el sitio de división {Bramhill, 1994 #705} {Buddelmeijer, 2002 #703} {de Boer, 1992 #706} {RayChaudhuri, 1992 #707}. Cuando el cultivo de un mutante termosensible del gen *ftsZ*, es transferido a la temperatura no permisiva resulta en una perturbación de la división celular, producción de larga cadenas filamentosas de células conectadas y la pérdida de la habilidad de formar colonias {Dai, 1991 #697}. La proteína FtsZ de *E. coli* es codificada por un transcrito policistrónico a partir del cual también se producen otras dos proteínas, FtsA y FtsQ, las cuales participan en el andamiaje de FtsZ en el sitio de división celular {Buddelmeijer, 2002 #703} {Dai, 1992 #701} {Flardh, 1998 #702}. Mukherjee y Donachie {Mukherjee, 1990 #704} describieron que la traducción de *ftsZ* es más eficiente que la de *ftsA*, la cual, a su vez, es traducida más eficientemente que *ftsQ* {Mukherjee, 1990 #704}.

Trabajos anteriores han demostrado que la RNasa E corta el transcrito *ftsQAZ* entre los genes contiguos *ftsA* y *ftsZ*, y que la disfunción de la RNasa E decrece el ratio entre los transcritos de los genes *ftsA* y *ftsZ* {Cam, 1996 #482}. El gen *ftsZ* gene es transcrito desde al menos 6 promotores encontrados dentro de la región codificante de los genes *ddlB*, *ftsQ* y *ftsA* situados corriente arriba del cistron *ftsZ* (Fig. 1.17). La contribución de cada uno al rendimiento global de la transcripción ha sido estimada mediante la construcción de diferentes fusiones transcripcionales con los promotores de *ftsZ* y el gen *lacZ* {Flardh, 1998 #702}. El promotor más proximal, *ftsZ2p*, contribuye con menos del 5% del total de la transcripción (que alcanza *ftsZ*). Los promotores *ftsZ4p* y *3p* ambos localizados dentro de *ftsA*, producen aproximadamente el 37% de la transcripción. Un *ftsAp* promotor dentro del gen *ftsQ* produce el 12% del total de la transcripción. La mayor proporción de la transcripción aproximadamente el 46% deriva de *ftsQ2p* y *1p*, los cuales está localizados dentro del gen *ddlB* {Flardh, 1998 #702} y dan

lugar a un largo transcrito policistrónico *ftsQAZ* (Fig. 1.17). Ha sido descrito que las diferentes especies de transcritos policistrónicos generados por los diferentes promotores son procesados por la RNasa E en el extremo 3' de *ftsA* y que esto afecta a la degradación de los mRNAs de *ftsA* y *ftsZ* {Cam, 1996 #482}. Además, se ha sugerido que estos cortes son requeridos para la eficiente expresión del gene *ftsZ* {Flardh, 1998 #702}. Sin embargo, ha sido demostrado que la región proximal de *ftsZ* es necesaria para la eficiente expresión de *ftsZ*, lo cual está relacionado con que la acción de la RNasa E sobre el extremo 3' del cistron *ftsA* tiene un significativo papel en el control de la expresión de *ftsZ* {Cam, 1996 #482}.

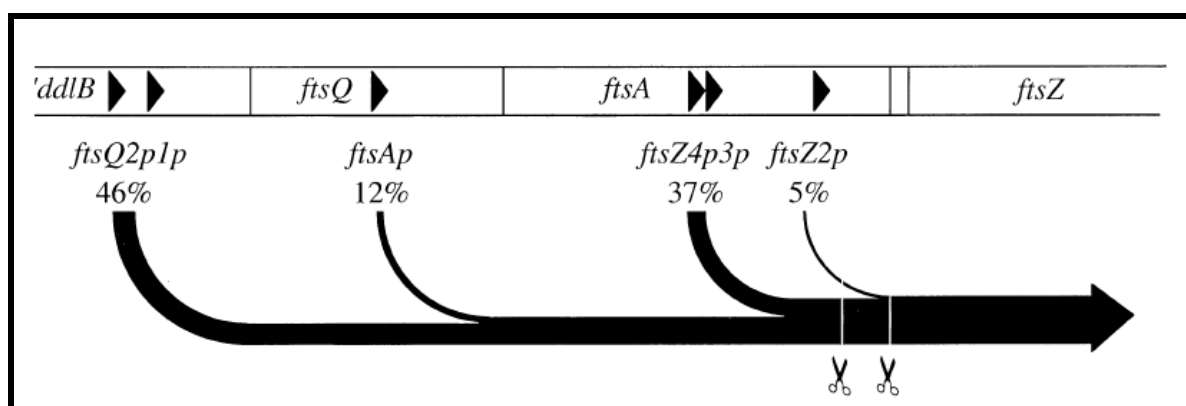


Figura 1.17. Modelo para la contribución de los promotores *ftsQAZ* para la expresión de *ftsZ*. La relativa contribución de cada promotor (*ftsAp* y *ftsZ2p*) o par de promotores (*ftsQ2p1p* y *ftsZ4p3p*) para la expresión total de *ftsZ* que comienza corriente debajo de *ddlB*. Las tijeras representan el sitio de procesamiento para la RNasa E.

Como la perturbación del ratio FtsZ/FtsA puede afectar la división celular {Dai, 1992 #701}, Cam y colaboradores {Cam, 1996 #482} especularon que la razón por la cual la RNasa E es esencial para la viabilidad celular resulta de su acción sobre el transcrito *ftsQAZ*. Además, ha sido publicado que la disminución de los niveles de FtsZ es la causa de la no viabilidad en células deficiente de la RNasa E {Takada, 2005 #268}. Sin embargo, Tamura y colaboradores {Tamura, 2006 #55} sugirieron que la depleción de la RNasa E decrece el ratio de las proteínas FtsZ/FtsA resultando en la formación de largas cadenas filamentosas de células, pero que ni la filamentación ni el descenso de los niveles de la FtsZ dan cuenta de la letalidad asociada con la disfunción de la RNasa E. Las formas filamentosas fueron revertidas en un mutante de la RNasa E mediante sobreproducción de la FtsZ, pero no la habilidad de formación de colonias mientras que

en mutantes de la RNasa E en donde se sobreexpresaba la RNasa G se revertía la habilidad de formación de colonias, pero no el fenotipo filamentoso causado por un descenso de los niveles de la FtsZ. Esto indica que el decrecimiento de la FtsZ observado en células con carencia de la RNasa E no daba cuenta de la esencialidad de la RNasa E {Tamura, 2006 #55}.

Objetivos

Objetivos.

Históricamente el estudio de la regulación de la expresión génica en procariotas se ha centrado principalmente a nivel de la transcripción e iniciación de la traducción. Por el contrario, sólo limitada atención ha sido dada a entender cómo la degradación y el procesamiento del RNA afectan a los niveles de proteínas y al crecimiento celular. La degradación de mRNA afecta a la síntesis de proteína, ya que determina la concentración de mRNA disponible para la traducción. Además, la disponibilidad de tRNA y rRNA maduros es esencial para el funcionamiento de la maquinaria molecular implicada en la síntesis de proteínas. Por tanto, para tener un completo conocimiento de la regulación de la expresión génica es crítico determinar los mecanismos moleculares que controlan el procesamiento y la degradación del RNA. El conocimiento de estos procesos en *E. coli*, está basado en la caracterización bioquímica de las enzimas implicadas y en estudios genéticos empleando cepas de *E. coli* con mutaciones en los genes que codifican para estas enzimas.

La RNasa E es una endorribonucleasa esencial de *E. coli*, implicada en la degradación y procesamiento del RNA, aunque no está claro si la pérdida de la viabilidad celular es debida a un defecto en la degradación del mRNA o a otras funciones tales como la maduración de tRNA o rRNA e incluso la división celular {Deana, 2004 #36} {Ow, 2002 #17} {Tamura, 2006 #55} . Enzimas homólogas a la RNasa E o a su dominio catalítico están presentes en la mayoría de los Gram negativos y algunos Gram positivos, Sin embargo, la región C-terminal no catalítica es la región menos conservada de la RNasa E y está implicada en la formación del complejo multienzimático degradosoma. El degradosoma presenta una gran plasticidad en cuanto a su composición dentro de las Proteobacterias, lo cual puede contribuir a la amplia variedad de nichos que estas bacterias pueden habitar {Carpousis, 2007 #284}. Por tanto, el estudio funcional de la RNasa E nos puede dar detalles de las rutas de degradación y procesamiento del RNA en procariotas.

Con el fin de esclarecer qué aminoácidos están implicados en la especificidad o catálisis, cuál es la función metabólica esencial de la RNasa E para soportar la viabilidad de *E. coli* y qué papel juega el degradosoma en el metabolismo del RNA, definimos los siguientes objetivos específicos:

1. Generación de mutantes termosensibles de la versión truncada de la RNasa E, que contiene los primeros 417 aminoácidos de la región catalítica y posteriormente transferir dichas mutaciones a la versión completa de la RNasa E.
2. Analizar *in vivo* el procesamiento de rRNA y tRNA.
3. Analizar *in vivo* el efecto en la degradación del mRNA.
4. Analizar la regulación de la síntesis de la RNasa E de los mutantes termosensibles.
5. Examinar el efecto de estos mutantes en la morfología y división celular de *E. coli*.

Materiales y Métodos

2.1 Materiales.

2.1.1 Reactivos químicos.

Los reactivos necesarios para la elaboración de los diferentes tampones, soluciones, medios de cultivo y geles de electroforesis, fueron adquiridos de las siguientes compañías fabricantes de reactivos químicos y suministros microbiológicos: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Fisher Scientific (Pittsburg, PA, USA), Pierce (Rockford, IL, USA), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA), Promega (Madison, WI, USA), Ameresco (Solon, OH, USA) y Difco laboratorios (Detroit, MI, USA).

2.1.2 Isótopos radiactivos.

Para el marcaje radiactivo de los fragmentos de DNA obtenidos por PCR y oligonucleótidos que fueron utilizados como sondas en los diferentes northern-blot, southern-blot y reacciones de secuenciación se utilizaron los isótopos de ^{32}P en forma de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP. Los radioisótopos $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP fueron suministrados por la compañía Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA, USA) con unas actividades específicas de 3000 y 6000 Ci/mmol respectivamente, y una concentración de 10 mCi/ml.

2.1.3 Cepas bacterianas.

Todas las cepas usadas en este estudio son derivadas de la cepa MG 1693 (*E. coli*, stock center) y están descritas en la tabla 2.1. Las cepas SK3251 y SK9937 fueron construidas mediante electro transformación de los plásmidos pJRK-22 y pMOK13 respectivamente, en SK9705 y posterior desplazamiento del plásmido residente pQLK26.

Tabla 2.1 Cepas utilizadas en este trabajo

Cepa	Genotipo	Referencia
DH5 α	F' endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZ</i> YA- <i>argF</i>)U169, hsdR17(<i>r_K⁻ m_K⁺</i>), λ -	Hanahan, D
MC1061	F' Δ (ara-leu)7697 [<i>araD139</i>] _{B/r} Δ (<i>codB-lacI</i>)3 <i>galK16 galE15 λ' e14'</i> <i>mcrA0 relA1 rpsL150(strR) spoT1 mcrB1 hsdR2(r^m)</i>	Caasadabany Cohen (1980)
MG1693	<i>thyA715 rph-1</i>	<i>E. coli</i> Genetic Stock center
SK2681	<i>rneΔ 1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pDHK2 (<i>rneΔ610 Sm^r/Sp^r</i>)/pWSK129(Km^r)</i>	Este trabajo
SK2685	<i>rneΔ 1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pDHK6 (<i>rneΔ645 Sm^r/Sp^r</i>)/pWSK129(Km^r)</i>	Este trabajo
SK3163	<i>rneΔ 1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK1 (<i>rneΔ645 -(his_g) Km^r</i>)</i>	Este trabajo
SK3244	<i>rneΔ 1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK12 (<i>rneΔ645/389-(his_g) Km^r</i>)</i>	Este trabajo
SK3245	<i>rneΔ 1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK13 (<i>rneΔ645/68-(his_g) Km^r</i>)</i>	Este trabajo
SK3246	<i>rneΔ 1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK21 (<i>rneΔ645/204-(his_g) Km^r</i>)</i>	Este trabajo
SK3247	<i>rneΔ 1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK91 (<i>rneΔ645/264-(his_g) Km^r</i>)</i>	Este trabajo
SK3248	<i>rneΔ 1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK51 (<i>rneΔ645/126-(his_g) Km^r</i>)</i>	Este trabajo
SK3249	<i>rneΔ 1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK7 (<i>rneΔ645/287-(his_g) Km^r</i>)</i>	Este trabajo
SK3250	<i>rneΔ 1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK11 (<i>rne-389 Cm^r</i>)</i>	Este trabajo
SK3251	<i>rneΔ 1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK22 (<i>rne-204 Cm^r</i>)</i>	Este trabajo
SK3252	<i>rneΔ 1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK92 (<i>rne-264 Cm^r</i>)</i>	Este trabajo
SK3253	<i>rneΔ 1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK14 (<i>rne-68 Cm^r</i>)</i>	Este trabajo

Cepas	Genotipo	Referencia
SK3254	<i>rneΔ1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK15 (me-126 Cm^r)</i>	Este trabajo
SK3255	<i>rneΔ1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK16 (me-287 Cm^r)</i>	Este trabajo
SK3257	<i>rneΔ1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK (me203/204 Cm^r)</i>	Este trabajo
SK3260	<i>rneΔ1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK40 (me203 Sm^r/Sp^r)/pWSK129(Km^r)</i>	Este trabajo
SK3264	<i>rneΔ1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK41 (me203/204 Sm^r/Sp^r)/pWSK129(Km^r)</i>	Este trabajo
SK3269	<i>rneΔ1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK24 (me-204/203 Cm^r)</i>	Este trabajo
SK3270	<i>rneΔ1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK23 (meΔ645/204 Km^r)</i>	Este trabajo
SK3271	<i>rneΔ1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK42 (meΔ645/204 Sm^r/Sp^r)/pWSK129(Km^r)</i>	Este trabajo
SK3273	<i>rneΔ1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK60 [meΔ645/389-(his₆) Km^r]</i>	Este trabajo
SK3274	<i>rneΔ1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK61 [meΔ645/68 -(his₆) Km^r]</i>	Este trabajo
SK3275	<i>rneΔ1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK62 [meΔ645/204 -(his₆) Km^r]</i>	Este trabajo
SK3276	<i>rneΔ1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK63 [meΔ645/264 -(his₆) Km^r]</i>	Este trabajo
SK3277	<i>rneΔ1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK64 [meΔ645/126 -(his₆) Km^r]</i>	Este trabajo
SK3278	<i>rneΔ1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pJRK65 [meΔ645/287-(his₆) Km^r]</i>	Este trabajo
SK9705	<i>rneΔ1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pQLK26 (rne⁺ Km^r)</i>	Este trabajo
SK9714	<i>rneΔ1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pSBK1 (rne⁺ Cm^r)</i>	Este trabajo

Cepas	Genotipo	Referencia
SK9937	<i>rneΔ 1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pMOK13 (me-1 Cm^r)</i>	Este trabajo
SK9957	<i>rneΔ 1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pMOK15 (meΔ610 Cm^r)</i>	Este trabajo
SK10143	<i>rneΔ 1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pMOK44 (me^r Sp^r)/pWSK129(Km^r)</i>	Este trabajo
SK10144	<i>rneΔ 1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pMOK45 (me-1 Sp^r)/pWSK129(Km^r)</i>	Este trabajo
SK10103	<i>rneΔ 1018::bla thyA715 rph-1 recA56 srl-300::Tn 10 Tc^r/pMOK29 (rneΔ645 Cm^r)</i>	(Ow&Kushner 2002)
XL-1 blue	<i>endA1 gyrA96(nal^r) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'⁺ ::Tn10 proAB⁺ lacI^r Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)</i>	Stratagene

2.3 Medios de cultivo.

2.3.1 Medios líquidos

Caldo de Luria-Bertani (LB)

Como medio rutinario para el crecimiento en medio líquido de las diferentes cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo, se usó el medio líquido completo de Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989). Todos los ingredientes fueron añadidos a un vaso precipitado, agitados y calentados hasta disolverse completamente. Posteriormente, se ajustó el pH a un valor de 7 con NaOH. Se distribuyó el LB en diferentes botellas de vidrio, se autoclavó a una temperatura de 121°C y a una presión de 15lb/in² durante un periodo de 20 minutos. El medio LB fue conservado a temperatura ambiente hasta su uso. Los suplementos nutricionales y/o antibióticos, utilizados en caso necesario, fueron añadidos en condiciones asépticas al LB, justo antes de utilizarse el medio para crecer las bacterias. Antes de inocular las bacterias, el medio fue preincubado en la estufa hasta alcanzar la temperatura deseada (30°C, 37°C o 44°C).

Composición del medio líquido LB para 1L:

Bacto triptona	10g (1%)
Bacto extracto de levadura	5g (0.5%)
NaCl	10g (1%)
dH ₂ O	Añadir hasta alcanzar 1 litro
Ajustar el pH a 7 con 1 N de NaOH	1-2 ml de 1N de Na OH.

Medio YENB.

Para preparar células electrocompetentes con una alta eficiencia es esencial tener una resistencia lo más alta posible, esto se consigue eliminando todos los restos de sal de la suspensión celular usada en la electroporación. Por esta razón, para preparar las células electrocompetentes nosotros utilizamos un medio de crecimiento compuesto de extracto de levadura y caldo de nutrientes (medio YENB), carente de NaCl. Este medio es capaz de soportar el crecimiento de la mayoría de las cepas de *E. coli*, incluidas las cepas *recA* (comúnmente usadas para la electroporación).

Composición del medio YENB para 1L:

Extracto de levadura	7.5g (0.75%)
Caldo de nutrientes	8g (0.8%)
dH ₂ O	Añadir hasta alcanzar 1 litro

Medio SOB+Magnesio.

El caldo super óptimo (SOB) fue desarrollado por Douglas Hanahan {Hanahan, 1983 #548}. El medio SOB suplementado con MgCl₂ y MgSO₄ fue esterilizado mediante recipientes de filtración a vacío Millipore de 0,22 µm de tamaño de poro.

Composición del medio SOB+Magnesio para 1L:

Bacto triptona	20g (2%)
Bacto extracto de levadura	5g (0.5%)
NaCl	0.584g (10mM)
KCl	0.186g (2.5mM)

MgSO ₄	2.408 g (20mM)
MgCl ₂	0.952 g (10mM)
dH ₂ O	Añadir hasta alcanzar 1 litro
Ajustar el pH a 7 con 1N de NaOH	1-2 ml de 1N de Na OH.

Medio SOC.

El caldo super óptimo con represión de catabolito (Medio SOC) es igual que el medio SOB, pero suplementado con glucosa. Una vez añadida la glucosa, el medio SOC es filtrado.

Composición del medio SOC para 1L:

Bacto triptona	20g (2%)
Bacto extracto de levadura	5g (0.5%)
NaCl	0.584g (10mM)
KCl	0.186g (2.5mM)
MgSO ₄	2.408 g (20mM)
MgCl ₂	0.952 g (10mM)
Glucosa	3.603 g (20mM)
dH ₂ O	Añadir hasta alcanzar 1 litro
Ajustar el pH a 7 con 1N NaOH	

2.3.2 Medios de crecimiento sólidos

LB agar.

El medio sólido LB agar se preparó igual que el medio líquido, pero añadiendo 15 g/litro de agar para solidificar el medio LB. Después de autoclavar el medio, se dejó enfriar hasta aproximadamente 40-50°C y se añadieron los suplementos nutricionales y/o antibióticos, en caso necesario. A continuación, el medio fue agitado vigorosamente, vertido sobre cada placa de Petri estéril (de 25 a 30 ml), la posible espuma generada en la superficie del medio fue eliminada flameando con un mechero Bunsen y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

Las placas de medio solidificado fueron guardadas a 4°C, colocadas en posición boca abajo dentro de bolsas de plástico y aquellas que contenían tetraciclina fueron mantenidas en condiciones de oscuridad, debido a la fotosensibilidad de la tetraciclina, hasta su uso. Antes de sembrar las bacterias, las placas fueron incubadas a 37 °C en la estufa durante 20 minutos, dejando la tapa abierta para eliminar el agua condensada en la superficie interna de la tapa de la placa de Petri.

Composición de LB agar para 1 L:

Tryptona	10g (1%)
Extracto de levadura	5g (0.5%)
NaCl	10g (1%)
Agar	15g (1.5%)
Agua destilada	Añadir hasta alcanzar 1 litro
Ajustar el pH a 7 con NaOH	

Medido mínimo.

Composición del medio mínimo para 1L:

(NH ₄) SO ₄	10g
KHPO ₄	5g
NaCl	10g
Agar	15g
Agua destilada	Añadir hasta alcanzar 1 litro
Ajustar el pH a 7.5 con NaOH	Aprox. 1 ml de 1N de Na OH.

2.3.3 Suplementos nutricionales.

Timina

La mayoría de las cepas utilizadas fueron derivadas de la cepa de *E. coli* MG1693 (*thyA715*; proporcionada por B. Bachmann, *E. coli* Genetic Stock Center, Universidad de Yale). El gen *thyA* codifica la enzima timidilato sintasa, esencial para la síntesis *de novo* de desoxitimina monofosfato (dTMP) a partir de la desoxiuridina

monofosfato (dUMP). Por tanto, todas las cepas serán incapaces de sintetizar DNA, ya que no pueden producir dTMP, dTDP, dTTP, si no se añade timina al medio de cultivo. Los medios fueron suplementados con una concentración final de 50µg/ml de timina.

2.3.4 Antibióticos

Los antibióticos ampicilina (Ap), kanamicina (Km), estreptomycin y espectomicina fueron preparados como soluciones acuosas y los antibióticos tetraciclina (Tc) y cloranfenicol (Cm) fueron preparados como soluciones alcohólicas. Antibióticos preparados como soluciones acuosas fueron esterilizados mediante el uso de filtros de 0.22 µm (Nalgene) para jeringas. Los stocks de antibióticos fueron conservados a -20°C. La concentración de los stocks y las concentraciones finales de los antibióticos fueron las siguientes:

Antibiótico	Disuelto en	Concentración Stock (mg/ml)	Concentración final (µg/ml)
Ampicilina	dH ₂ O	4	50
Cloranfenicol	Etanol	10	20
Espectinomicina	dH ₂ O	10	100
Estreptomycin	dH ₂ O	50	30
Kanamicina	dH ₂ O	10	50
Tetraciclina	Etanol al 70%	12	12

Tabla 2.2 Soporte informático.

Aplicación	Programa	Dirección web/compañía
Búsqueda homologías	Blast	blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Diseño oligonucleótidos	Primer_3	frodo.wi.mit.edu
Mapas de restricción	NEBCutter	tools.neb.com/NEBcutter2/index.php
Alineamiento secuencia	ClustalW	ebi.ac.uk/Tools/clustalw2
Lectura de secuencias de DNA	Chromas	mb.mahidol.ac.th/pub/chromas
Representación gráfica	Kaligraph	
Lectura DNA/RNA radiactivo	ImageQuant™	Molecular Dynamics
Visualización estructuras	3D PyMol	pymol.org
Análisis de geles	QuantityOne	BioRad

2.2 Métodos.

2.2.1 Conservación de las cepas bacterianas mediante criocongelación.

Las diferentes cepas construidas y utilizadas en este trabajo fueron conservadas, para ello una colonia de cada una de la diferentes cepas fue crecida en medio líquido complejo Luria-Bertani (LB) suplementado con timina (50µg/ml) y antibiótico dependiendo de la resistencia de cada cepa, cloranfenicol (20µg/ml), kanamicina (50µg/ml), ampicilina (50µg/ml), espectinomicina (100µg/ml), estreptomycin (30µg/ml), tetraciclina (12µg/ml) . Los cultivos fueron crecidos toda la noche (12-16 horas) a 37°C con aireación intensa mediante una agitación 250 rpm. Posteriormente, se criocongelaron usando como crioprotector el glicerol a una

concentración final de glicerol de 15%, para ello 0.5 ml de cultivo fresco saturado fueron diluido con 1.5 ml de solución de glicerol (60% glicerol v/v; 0.1 MgSO₄; 0.025M Tris-Cl, pH 8.0) y depositado en crioviales de 2 ml (Nalgene, Rochester, NY, USA). Cada uno de los crioviales se congeló directamente a -80°C. Todas las cepas fueron conservadas a esta temperatura hasta su posterior uso. Para recuperar las células del estado congelado, se toma un pedacito del cultivo congelado con un palillo estéril y se deja que los cristales de hielo se descongelen sobre una placa de agar y después se extiende con el palillo por toda la placa y se dejan a 37°C en una estufa de incubación.

2.2.2 Curvas de crecimiento a 37°C y 44°C.

Para realizar las curvas de crecimiento una colonia fue tomada con el asa de siembra previamente esterilizada a la llama de un mechero Bunsen. La colonia fue preinoculada en 5 ml de medio LB suplementado con timina y antibiótico cuando fuera necesario e incubado durante toda la noche en un incubador Hotpack modelo 352700 (phila., PA., USA) a 30°C. A la mañana siguiente se realizaba coge un poco de este y se introducía en un frasco Klett Pyrex N° 4980 (USA) de 250ml.

Los cultivos fueron crecidos rutinariamente en el medio líquido complejo Luria-Bertani (LB) suplementado con timina (50µl/ml) y con antibiótico cuando fuera necesario en las siguientes concentraciones: cloranfenicol, 25µg/ml; kanamicina 25µg/ml; ampicilina, 100µg/ml; espectinomicina, 25µg/ml y estreptomicina, 25µg/ml; dependiendo de la resistencia a antibióticos de cada cepa, en un baño de agua termostático giratorio New Brunswick scientific Edison modelo G76 (N.J., USA) a 30 °C y con vigorosa agitación hasta que alcanzaron entre 40-45 unidades Klett (1×10^8 - 1.1×10^8 células/ml; usando el filtro verde número 42). Una vez alcanzada esta densidad, los cultivos fueron incubados a 37°C en un icubador Hotpack modelo 352700 (phila., PA., USA) o 44°C en un incubador Hotpack modelo 351200 (phila., PA., USA) con vigorosa agitación.

La densidad de los cultivos fue monotorizada cada 30 minutos a partir del cambio de temperatura de incubación. Los cultivos fueron diluidos a la mitad con medio fresco a 37°C o 44°C cuando alcanzaron las 70 unidades Klett para mantenerlos en fase exponencial. Las unidades Klett fueron ajustadas con el apropiado factor de de

dilución para representar gráficamente las curvas de crecimiento.

2.2.3 Métodos de purificación y análisis de ácidos nucleicos.

2.2.3.1 Aislamiento DNA plásmidico mediante mini-preparación.

Los plásmidos de interés contenidos en las diferentes cepas hospedadoras de *E. coli* transformadas fueron extraídos mediante mini-prep por lisis alcalina y cromatografía de columna usando el QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA). Cultivos de 3-5ml fueron crecidos durante toda la noche. Al siguiente fue centrifugado a 6.000g. Las mini-preparaciones plasmídicas fueron realizadas según indicaban las instrucciones del fabricante y con ligeras modificaciones para mejorar la calidad y el rendimiento: la lisis fue realizada durante sólo dos minutos, y después de añadir el buffer de elución o agua se dejó durante 3 minutos antes de realizar la última centrifugación.

2.2.3.2 Digestión de DNA con enzimas de restricción.

Plásmidos y fragmentos de PCR fueron digeridos con enzimas de restricción de la siguiente manera: 1-3 µg aproximadamente de plásmido o 2 µg de fragmento de PCR, 2 µl de 10X buffer de la enzima y de 10 a 20 unidades de enzima de restricción en un volumen final de 20 µl. Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 2-4 horas. El DNA digerido fue analizado mediante electroforesis en geles de agarosa como se describe en el siguiente apartado.

2.2.3.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Mini-geles de agarosa fueron utilizados como herramientas de diagnóstico rápido para determinar el tamaño y pureza del DNA previamente purificado. Geles de agarosa al 0.6-1.5% preparados en tampón TAE 1X (40mM Tris acetate, 2mM Na₂EDTA pH 8.5 en agua destilada). Las muestras fueron mezcladas con 2µl de tampón de carga 6X (0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de xilano cianol FF y 30% de glicerol en agua destilada estéril). Para determinar el tamaño de las muestras sometidas a electroforesis se emplearon los marcadores de peso molecular λ/HindIII (NEB) y 1Kb ladder DNA (NEB). Las electroforesis fueron realizadas en una cubeta de

electroforesis horizontal de geles conectada a una fuente de alimentación (Bio-Rad) durante 30 minutos-1 hora a 80-100V. Los geles fueron teñidos en una bandeja durante 15 minutos con una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y posteriormente lavados con agua destilada. A continuación los geles fueron iluminados mediante un transiluminador de luz ultravioleta de 312nm (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA) y un registro fotográfico fue obtenido mediante una cámara fotográfica (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA) acoplada al transiluminador.

2.2.3.4 Extracción y purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa.

Los plásmidos digeridos o productos de PCR fueron purificados a partir de geles de agarosa para utilizarlos en reacciones de ligación y como moldes para las sondas de DNA para los Northern. Después de la digestión enzimática del DNA, los fragmentos resultantes fueron separados mediante electroforesis. Fragmentos de agarosa conteniendo las bandas de DNA de interés fueron obtenidos mediante el corte de la banda del gel de agarosa usando una hojilla estéril y colocada en un tubo de microcentrifuga y pesados en una balanza. El DNA fue purificado y extraído de los fragmentos de geles de agarosa mediante el QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA purificado fue utilizado para la construcción de diferentes plásmidos.

2.2.3.5 Ligación de fragmentos de DNA.

Los plásmidos e insertos fueron digeridos y purificados como se describe en los apartados 2.2.3.2 y 2.2.3.4 respectivamente. Los fragmentos de DNA fueron ligados usando la siguiente reacción: una cantidad de vector e inserto fueron mezclados (las relaciones vector:inserto usadas fueron 1:1, 1:4 y 1:6) con 1.5 µl de ATP 10 mM, 1.5 µl de buffer 10X y 1.5 µl de ligasa T4 (Epicentre® Biotechnologies, Madison, WI, USA) en un volumen total de 15 µl durante 30 minutos a temperatura ambiente.

2.2.3.6 Secuenciación de DNA.

2.2.3.6.1 Secuenciación automática.

Las mutaciones específicas dentro del alelo *rneΔ645* de los plásmidos termosensibles fueron identificadas mediante secuenciación automática. Las reacciones de secuenciación de los alelos mutantes de *rneΔ645* fueron realizadas usando el Kit BigDye[®] terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Dichas reacciones fueron realizadas de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y usando los primers:

Primer	Secuencia 5'→3'
rne+137	AGCTTCCAGACTCGGTTCAATGCG
rne+267	GGACGACCATGAGCATGTAG
Qlrne21	CGATATCCAGGTCATACAGACGC
rne+516	CACCGCATTGAACCGAG
rne+747	GTAGCTATCTGGTTCTG
rne+1006	GAGCAACGTAATCGTTC
rne+1469	GAAGCGGTGCGTCAGGA

La región codificante del alelo *rneΔ645* conteniendo mutaciones en cualquier dominio fueron subclonadas mediante la doble digestión con KpnI/XbaI del plásmido mutado y posterior ligación del fragmento resultante con el plásmido pWSK 129 para asegurarnos que el fenotipo termosensible observado era debido únicamente a la mutación identificada y no al resto del plásmido.

2.2.3.6.2 Secuenciación en geles desnaturalizantes de urea-poliacrilamida.

Para comprobar si los recombinantes portaban las esperadas mutaciones puntuales generadas mediante mutagénesis dirigida, los plásmidos fueron secuenciados. La secuenciación se realizó siguiendo el método descrito por Sanger et al. (Sanger et al.,1977), basado en el uso de dideoxirribonucleótidos de adenina, guanina, citosina y timina para introducir paradas aleatorias durante la reacción de

polimerización a partir del oligonucleótido usado como cebador en la reacción. El radionucleótido empleado para marcar radiactivamente en el extremo 5' de fragmentos de distintos tamaños generados en dichas reacciones fue el γ -³²P ATP (5.000 Ci/mmol). Los primers utilizados eran homólogos a secuencias de la región N-terminal de la RNasa E cercanas a la región que se quería secuenciar. Los reactivos y la DNA polimerasa utilizados en las reacciones fueron los proporcionados por el *fmol*[®] DNA Cycle Sequencing System (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de las reacciones de secuenciación se separaron en geles de poliacrilamida al 6% y 7 M de urea en tampón TBE utilizando. La electroforesis fue desarrollada entre 45 y 50 °C de temperatura y a unos 1.500 voltios. El tiempo de electroforesis variaba en función de la distancia del primer utilizado y la región a secuenciar. Terminada la electroforesis los geles se colocaron sobre papel Whatman 3MM y se secaron usando un secador de geles. Una vez secado los geles estos eran expuestos a películas Kodak () en cassetes de exposición Kodak a -80 °C durante toda la noche.

2.2.3.7 Extracción de RNA.

Las cepas estudiadas fueron crecidas en medio líquido Luria-Bertani suplementado con timina (50 µl/ml) y cloranfenicol (o kanamicina (25 µl/ml) 25 µl/ml) hasta alcanzar las 40 unidades Klett, en ese mismo momento fueron incubadas a 44 °C durante 2 horas y mantenidas en la fase media exponencial mediante diluciones con medio de cultivo fresco.. Las células fueron recolectadas entre 70 y 80 unidades Klett. Un volumen de 5 ml de cada uno de estos cultivos fue mezclado con un volumen semejante de bufer Crushed-ice buffer TM (10mM tris, pH 7.2, 5mM MgCl₂) conteniendo 20 mM de NaN₃ y cloranfenicol disuelto en 95% de etanol a 0.4 mg/ml. Las células fueron centrifugadas a 6.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y el pellet fue resuspendido en 0.4 ml de lisis bufer, 1ml de TM 1X conteniendo lisozima (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 0.3 mg/ml y DNasa I libre de RNasa (Roche) a 32 unidades/ml. Después de tres ciclos de congelación y descongelación, usando para ello hielo seco en etanol y un baño termoestático a 37 °C. Las muestras fueron guardadas a -80 °C hasta la extracción de RNA. Un volumen de 68 µl de 20mM de ácido acético fue añadido a las

muestras congeladas . Un vez descongeladas, se añadió 0.4 ml de Catrimox-14 (Iowa Biotechnology, Oakdale, IA). El resultante precipitado formado por proteínas, DNA y RNA fue separado mediante centrifugación a 13.000 rpm a durante 10 minutos a 4 °C. El pellet fue resuspendido en 1 ml de LiCl 2M en etanol al 35% y centrifugado a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Posteriormente fue resuspendido en un ml de LiCl 2M en agua destilada y centrifugado igual que en el paso anterior. El pellet fue lavado dos veces con etanol al 70%, secado en un Speed Vac... y resuspendido en 0.1 ml de agua destilada. Las muestra se dejaron a 4 °C durante toda la noche para que el RNA se disolviera. La concentración de RNA fue cuantificado mediante la lectura en un espectrofotómetro a 260 nm (O'Hara et al., 1995) y las muestra fueron cargadas en un gel de agarosa para determinar la calidad del RNA.

2.2.3.8 Análisis Northern Blot del procesamiento de tRNA y rRNA.

Para cada muestra, 5 µg de RNA fueron desnaturalizado en formamida conteniendo 0.3% de xilano cianol, 0.3% de azul de bromofenol y 0.37% de EDTA. Los fragmentos de RNA fueron separados en un gel al 6% de poliacrilamida conteniendo 7M de urea, en buffer TBE 1X (89 mM Tris base, 90 mM ácido bórico, 2.5 mM EDTA) a 50 °C a 40 mA de corriente constante. El RNA fue electrotransferido a una membrana Biotrans Plus (ICN) a 15 V durante una hora y dos horas mas a 40 V en búfer TAE 1X (18 mM Tris base, 9.0 M de acetato sodico, 0.9 mM EDTA). Las membranas fue incubadas a 90 C durante 30 minutos y luego expuestas a luz UV durante 30 segundos para fijar el RNA. Las sondas utilizadas en las hibridaciones fueron marcadas con ³²P e hibridadas a una temperatura de diez grados por debajo de su temperatura de de disociacion, lavadas con SSC 2X y 0.3 de solución dodecil sulfato de sodio antes de ser expuestas al casset o a la película (O'Hara et al., 1995). Los Northern fueron analizados usando el Storm 840™ phosphoimager fabricado por Amersham Biosciences (Piscataway, NJ). la cuantificacion de las imagenes fue realizado usando el software ImageQuant v5.2 (Molecular Dynamics).

2.2.4 Transformación en células competentes.

2.2.4.1 Preparación de células competente Método RbCl (método Kushner)

Para la transformación química, las células fueron preparadas mediante el método de RbCl (Kushner). Una colonia de una placa de LB agar suplementado con timina (50µg/ml) y cloranfenicol (20µg/ml) o kanamicina (50µg/ml), dependiendo de la resistencia a antibióticos de cada cepa fue inoculada en 5 ml de medio líquido y crecida durante toda la noche con agitación. El cultivo fue diluido 1:100 y crecido hasta alcanzar 60 unidades klett. Las células fueron centrifugadas durante 10 minutos a 5000 rpm a 4 °C. Las células fueron resuspendidas en 10 ml de medio TFB 1 (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM acetato potásico, 10 mM CaCl₂, 15% glicerol, pH 5.8), y centrifugadas otra vez. El pellet fue resuspendido en 10 ml de TFB2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% glycerol, pH 6.8) y centrifugado como anteriormente. Las células fueron incubadas a hielo durante 30 minutos en 1 ml de TFB2. Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 100 µl de TFB2 y se mezcló con 4-8 µl del plásmido y se incubó en hielo durante 1 hora. El choque térmico fue realizado 42 °C durante 1 minuto. A continuación se centrífugo el pellet, se resuspendió en 3 ml de SOC y se incubó a 37 °C durante una hora. Posteriormente se centrífugo, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió en 1ml de SOC y se sembraron 100 µl de células en placa con medio selectivo.

2.2.4.2 Preparación de células electrocompetentes.

Las células electrocompetentes fueron preparadas tal y como describen (Sharma and Schimke, 1996 Biotechniques) usando un medio libre de sal denominado YENB (medios). Se preparó un inóculo que fue crecido toda la noche en medio YENB. Al día siguiente se inoculó 10 ml del cultivo crecido toda la noche en 1 L de medio fresco YENB. El cultivo fue crecido en agitación (250 rpm) y a 37°C durante 4-5 horas hasta alcanzar una OD₆₀₀ de aproximadamente 0.5. Las células fueron recogidas en dos botellas estériles de policarbonato de 500 ml previamente enfriadas a 4°C mediante centrifugación a 4°C durante 10 minutos a 4000g en un rotor JA-10. Se retiró el sobrenadante y el pellet fue lavado dos veces con 100 ml de agua destilada estéril y

fría, y centrifugando igual que antes. Se descartó el sobrenadante, el pellet fue resuspendido en 20 ml de glicerol frío al 10% y centrifugado igual que antes. Se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células en 2 ml de 10% de glicerol. Las células fueron alicuotadas en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml (40 µl/tubo) y colocadas en una caja con hielo seco y etanol hasta su congelación. Posteriormente se guardaron a -80°C hasta su uso.

2.2.4.3 Transformación

Para transformar se descongelan los tubos de microcentrífuga con las alícuotas de células competentes guardados a -80 °C, se añaden entre 3-5 µl de la reacción de ligación, se mezclan suavemente con una punta de pipeta y se incuban durante 1 hora en hielo. Aplicar un golpe de calor de 45 segundos a 37 °C en un baño termostático de agua. Se añade 1 ml de SOC a las células y se incuba a 37 °C durante 45 minutos para permitir la expresión de los genes de resistencia a antibióticos. A continuación 100 µl de cultivo fueron sembrados en una placa de LB agar contiendo el apropiado antibiótico e incubado a 37 °C durante toda la noche.

2.2.4.4 Electroporación

Las electroporaciones fueron llevadas a cabo en el electroporador Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) bajo las siguientes condiciones: 200 Ω, 2,5 µF, 2,5 KV. Cada transformación fue realizada de la siguiente manera: una alícuota de 40 µl de células electrocompetentes fue descongelada y mezclada con volumen de 1-2.5 µl (0,05-0,2 µg/µl) de plásmido disuelto en agua o reacción de ligado previamente dializado contra agua estéril durante 30 minutos a temperatura ambiente usando filtros tipo VS (0.025 µm de tamaño de poro; Millipore, Bedford, MA) para evitar un arco eléctrico. La mezcla se añadió a una cubeta de electroporación (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) estéril de 2 mm de distancia entre los electrodos de aluminio previamente enfriada en hielo. Se aplicó un pulso eléctrico sencillo de una duración de 5-6 msec a la suspensión de células y DNA plasmídico, se añadió 1 ml de SOC para recuperar las células y se transfirió la mezcla a un tubo de ensayo. Se incubó a 37°C durante 45 minutos y luego se extendieron unos 10-50 µl de

suspensión celular a cada placa de Petri con agar y medio selectivo utilizando un asa de Drigalski previamente esterilizado con etanol y a la llama. Se incubaron en un incubador a 37 °C durante 20 horas o hasta que aparecieran colonias.

2.2.5 Mutagénesis

2.2.5.1 Mutagénesis aleatoria *in vitro* del plásmido pJRK1.

El plásmido pJRK1 fue purificado usando Qiaprep spin miniprep kit (Qiagen, Valencia, CA). Tres microgramos del plásmido pJRK1 fueron incubados en presencia de 400 mM de hidroxilamina (NH₂OH), 50 mM de fosfato potásico (pH 6.6), 100 mM EDTA en un volumen final de 100 µl durante una hora a 65 °C seguido de una incubación a 37°C durante toda la noche. Todo el volumen fue dializado contra agua estéril durante dos horas a temperatura ambiente usando filtros tipo VS (0.025 µM de tamaño de poro; Millipore, Bedford, MA). A continuación se realizó precipitación con etanol y lavado con etanol al 70%. El DNA plasmídico fue resuspendido en 20 µl de agua destilada.

2.2.5.2 Aislamiento de mutantes termosensibles.

Células SK9714 electrocompetentes fueron electrotransformadas con 80ng de plásmido mutagenizado e incubadas a 30 °C en LB suplementado con timina y 50 µg/ml de kanamicina. Los cultivos fueron diluidos cada 12 horas con medio fresco durante tres días, de forma que el plásmido residente de la cepa SK9714 fuera desplazado por aquellos plásmidos mutagenizados, que retuvieran actividad catalítica, al menos a 30 °C. A los tres días los cultivos fueron diluidos de tal forma que hubieran entre 300 y 3000 células/ml, y 100 µl fueron sembrados en placas de LB agar suplementado con 50 µg/ml de timina y 50 µg/ml de kanamicina e incubadas a 30 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se realizó una réplica en placa y las placas replicadas fueron incubadas a 44 °C durante toda la noche.

Una única colonia termosensible por transformación fue elegida para posterior análisis asegurándonos de esta forma que los mutantes fueron generados por independientes eventos mutagénicos. Los mutantes termosensibles fueron verificados

por su incapacidad de crecimiento en LB agar y LB líquido conteniendo 50µg/ml de timina y 50µg/ml de kanamicina a 44°C. Los plásmidos de aquellos mutantes termosensibles fueron aislados y retransformados en SK9714. Después de tres días los transformantes fueron cultivados a 44 °C para verificar que el fenotipo termosensible era conferido únicamente por el plásmido mutado.

2.2.5.3 Replicación en placa.

Cuando las colonias bacterianas eran apenas visibles a simple vista en la placa maestra u original, fueron transferidas de esta placa a otras manteniendo el patrón original de distribución de las colonias en la placa. Para ello, se presionaba la placa maestra suavemente sobre un paño de terciopelo estéril que estaba sujeto mediante un aro de metal al bloque cilíndrico de replicación de modo que las colonias eran transferidas al paño de terciopelo. A continuación una nueva placa orientada de la misma manera que la original era ligeramente presionada sobre el terciopelo que tenía impresas las colonias de la placa original de forma que las colonias eran transferidas a la nueva placa. De esta misma forma varias placas fueron replicadas. Una de las placas replicadas fue incubada a 37 °C y otra a 44 °C mientras que la placa maestra así como otra placa de medio mínimo replicada fueron incubadas a 30 °C durante 24 horas. Posteriormente se analizó visualmente la capacidad de las colonias de crecer a las diferentes temperaturas.

2.2.6 Marcaje de sondas de DNA.

2.2.6.1 Marcaje radiactivo de oligonucleótidos en su extremo 5´.

Entre 20 y 30 pmoles de oligonucleótido se marcaron con 50 µCi de γ-32P ATP (>5.000 Ci/amol). Para realizar el marcaje radiactivo del extremo 5´ del oligonucleótido se utilizó la enzima polinucleótido kinasa del fago T4 (NEB, USA). La reacción se realizó en presencia del buffer suministrado por la casa comercial y 10 unidades de la enzima. La mezcla se incubó durante exactamente 30 minutos a 37 °C. La eficiencia del marcaje fue realizada mediante la aplicación de 1µl de la reacción de marcaje en un filtro Whatman DE-81. Se expuso durante 15 minutos bajo una lámpara de calor y

cuantificación en un contador de centelleo Beckman LS 2800. Posteriormente se realizaron dos lavados con una solución de fosfato sódico 0.5 M, un lavado con agua destilada y otro con etanol al 95%. Finalmente, el filtro fue secado bajo la exposición de la lámpara de calor durante 15 minutos y cuantificación en el contador de centelleo. La diferencia entre la cuantificación inicial y final obtenida con el contador de centelleo nos daba el % de eficiencia de incorporación del γ -³²P ATP a nuestra sonda.

2.2.6.2 Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA.

Los amplicones de DNA que fueron utilizados como sondas para las hibridaciones fueron extraídos y purificados a partir de geles de agarosa tal y como se describe en los apartados anteriores. Aproximadamente 100 ng de dichos amplicones se marcaron radiactivamente utilizando 5 μ Ci de α -³²P ATP (... Ci/amol). Para ello se empleó el Strip-EZ DNA labelling Kit (Ambion) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La eficiencia del marcaje fue realizada mediante la aplicación de 1 μ l de la reacción en un filtro Whatman DE-81, exposición durante 15 minutos bajo una lámpara de calor y cuantificación en un contador de centelleo Beckman LS 2800. Posteriormente se realizaron dos lavados con una solución de fosfato sódico 0.5 M, una lavado con agua destilada y otro con etanol al 95%. Finalmente, el filtro fue secado bajo la exposición de la lámpara de calor durante 15 minutos y cuantificación en el contador de centelleo. La diferencia entre la cuantificación inicial y final obtenida con el contador de centelleo nos daba la eficiencia de incorporación del γ -³²P ATP a nuestra sonda.

2.2.7 Extracción de Proteínas.

Para estudiar el fenómeno de la autorregulación de la RNasa E así como la expresión de FtsZ y FtsA a 37°C y 44 °C se aisló el contenido total de proteínas de diferentes cepas y se analizó mediante western Blot el patrón de expresión. Un volumen de 20 ml de cultivo de las diversas cepas fueron crecidas en medio líquido Luria-Bertani suplementado con 50 μ l/ml de timina y 20 μ l/ml de cloranfenicol hasta

aproximadamente 80 unidades Klett. Sin embargo, para analizar la autorregulación a 44 °C, 20 ml de cultivo de cada cepa fue crecida hasta 40 unidades Klett a 30 °C y luego incubada a 44°C, por al menos 30 minutos hasta que los cultivos alcanzaron aproximadamente 80 unidades Klett. Para mantener los cultivos en la fase exponencial de crecimiento, estos fueron diluidos con medio fresco atemperado a 44°C. Las células fueron recolectadas a 8.000 rpm a 4°C durante 8 minutos y resuspendidas en 300µl de Sigma Cell Lysis Buffer B (Sigma, St. Louis, MO, USA) conteniendo 40µl/ml de inhibidor de proteasa (Roche,. Cada suspensión de células fue sonicada tres veces durante 15 segundos y luego centrifugadas a 13.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El pellet fue descartado y el contenido proteico contenido en el sobrenadante fue determinado usando Bio-Rad Protein Assay, el cual esta basado en el método de valoración de proteínas de Bradford (Bradford, 1976).

2.2.7.1 Análisis de la expresión de la RNasa E mediante Western Blot.

Las proteínas obtenidas fueron desnaturalizadas mediante la incubación a 100 °C durante 5 minutos y la adición de un volumen igual de bufer de carga SDS/PAGE (60mM tris pH 6.8, 2% β-mercaptanol, 2% SDS, 10% glicerol, 0.01% azul bromofenol). Unos 10µg de cada muestra de proteína fueron electroforados en un gel al 8% SDS/PAGE y sumergido en búfer (24.9 mM tris base, 191.8mM glicina y 3.5 Dodecil sulfato de sodio) a 150 V. Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana PVDF (Immunobilon P, Millipore) en un bufer de transferencia (25mM tris base, 20% metanol y 192 mM glicina) a 100 V y a 4 C. La proteína RNasa E, fue detectada usando el anticuerpo RNasa E MAP, el cual reconoce los primeros 20 aminoacidos del extremo N-terminal en una dilución de 1:2000 (Ow et al., 2000). Posteriormente un segundo anticuerpo, Anti- inmunoglobulina de conejo, el cual esta acoplado con la peroxidasa del rábano fue usada para facilitar la visualización por fluorescencia. El ECL Plus™ Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) fue usado de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes. La membrana fue visualizada usando Storm 840™ phosphoimager de Amersham Biosciences. La cuantificación de las imágenes obtenidas fueron realizadas usando el software ImageQuant v.5.2 elaborado por Molecular Dynamics.

2.2.8 Técnicas de microscopía.

2.2.8.1 Microscopía de contraste de fase.

Las cepas fueron crecidas hasta 60 unidades klett a 30°C en un baño en agitación y en medio LB líquido suplementado con timina y cloranfenicol. Una vez alcanzada las 60 unidades klett, los cultivos fueron transferidos a otro baño a 44°C y crecidas hasta 4 horas. Muestras de 2 ml fueron coleccionadas después del cambio de temperatura y a diferentes tiempos. A dichas muestras fue añadido 40 µl de gluteraldeído y centrifugada a 5.000 rpm durante 10 minutos. Después de la centrifugación, el pellet fue resuspendido en 0.5 ml de LB frío. Un volumen de 4 µl de cada suspensión de células fue colocado en un porta-objetos previamente calentado a 60°C y mezclado con 4 µl de 4% de agarosa de bajo punto de fusión. Un cubre-objetos fue colocado encima del porta-objetos y sellado con esmalte de uñas transparente. Las células fueron fotografiadas con un aumento de ×400 usado un microscopio Zeiss.

2.2.8.2 Microscopía de fluorescencia con DAPI.

Las cepas estudiadas fueron crecidas en medio líquido Luria-Bertani suplementado con timina (50µl/ml) y kanamicina (25µl/ml). El tiempo cero fue obtenido cuando los cultivos crecidos a 37°C en agitación alcanzaban aproximadamente las 40 unidades Klett, (1×10^8 cells/ml; No. 42 green filter) y el punto del tiempo 2 horas de las muestras fue obtenido después de 2 horas exactas del cambio de temperatura. Las células de los cultivos fueron recolectadas por centrifugación a 13.000 rpm, a 4°C durante 7 minutos. Las células fueron inmovilizadas y teñidas con DAPI como previamente describieron (Hiraga *et al.*, 1988). Las células fueron lavadas una vez con solución salina (solución estéril de 0.84%) y luego resuspendidas en 1 ml de la misma solución. Unos 10µl de las muestras fueron extendidos en un porta-objeto de cristal cubierto de poly-L-lysine (Polysciences, Inc.) y secado a temperatura ambiente. Las muestras fueron fijadas con unas gotas de metanol durante 5 minutos. Después de la fijación, los portas fueron lavados 6 veces con agua corriente en una bandeja. Posteriormente, los portas fueron secado a

temperatura ambiente de nuevo para fijar la células completamente. Unos 10µl de una solución de DAPI (5µg/ml en solución salina), el cual se une al DNA, fueron depositados sobre las muestras. Un cubre objeto lavado previamente con etanol fue colocado sobre la muestra. Una gota de aceite de inmersión fue colocada entre el cubre objeto y el objetivo. Las células fueron fotografiadas con una magnificación de 100X con una cámara digital Hamamatsu (Shizuoka, Japan) modelo C-4742-95 acoplada a un microscopio de fluorescencia con óptica Nomarski y un software de Improvision Openlab.

2.2.9 Análisis bioinformático de la región N-terminal.

La búsqueda de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos fue realizada con el algoritmo BLAST frente las bases de datos de secuencias públicas. Nosotros usamos diferentes bases de datos de secuencias de proteínas pFAM (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>) {Finn, 2008 #569} ,COG {Natale, 2000 #571; Tatusov, 2000 #572} y Prodom {Corpet, 1998 #570} para analizar la posible existencia de dominios y motivos dentro de la región restringida que comprende los primeros 417 aminoácidos de la RNasa E. La base de datos especializada Pfam posee clasificaciones de familia de proteínas y datos de dominios de proteínas que nos permiten encontrar relaciones entre dominios funcionales entre proteína y cualquier otra propiedad de interés o clasificar así una proteína desconocida en una familia de proteína.

2.2.10 Construcción de plásmidos

2.2.10.1 pUG21: RneΔ645 etiquetada con una poli-his.

Para generar exclusivamente mutantes de la región catalítica N-terminal y poderlos purificar para posteriormente caracterizarlos *in vitro*, nosotros construimos un nuevo alelo *rneΔ645*-His, el cual codifica la proteína RneΔ645 fusionada a un polipéptido corto de histidina (etiqueta His) en el extremo C-terminal para facilitar la purificación de la proteína. Para construir alelo *rneΔ645*, el cual codifica para una forma truncada de la RNasa E de 417 aminoácidos, que contiene el domino N-terminal catalítico fue amplificado usando los primers *rne*-BspHI (5'-

AGTCTGTCATGAAAAGAATGTTAATCAAC-3') y *rne*Δ645-BglII (5'-ATCAGTA GATCTTTCGTTGTCA CGCACGGTGCC-3'), una Pfu DNA polimerasa (Stratagene) y el plásmido pMOK21 (*rne*Δ645) como molde. Los sitios de restricción introducidos para *Bsp*HI y *Bgl*II están subrayados. El fragmento de PCR de 1.3 Kb obtenido fue digerido con las enzimas de restricción *Bsp*HI y *Bgl*II y el resultante fragmento fue clonado entre los sitios de restricción del vector de expresión pQE60 (Qiagen), el cual añade una cola de de histidina (His₆-tag) al extremo C-terminal de la proteína. El plásmido resultante pGU21 codifica una versión truncada de la RNasa E, que consta de los primeros 417 aminoácidos de la RNasa E más 6 residuos de histidina. Para evaluar la actividad biológica de la proteína RneΔ645-His realizamos experimentos de complementación. Estos ensayo de complementación consistieron en transformar el plásmido de pGU21 en la cepa termosensible SK6610 (*rne-1, recA56*), incapaz de crecer a la temperatura no permisiva de 44°C. Posteriormente los transformantes fueron sembrados en placas de Petri con medio sólido y se evaluó su capacidad para formar colonias o viabilidad después de incubarlos 24 horas a la temperatura no permisiva de 44°C. La presencia de colonias a las 24 horas reveló la capacidad de la proteína RneΔ645-His de complementar a la cepa termosensible SK6610 (*rne-1, recA56*). Iniciales experimentos de purificación demostraron obtener grandes cantidades de la proteína RneΔ645-His con una homogeneidad mayor al 95%, usando procedimiento en dos pasos: precipitación mediante amonio persulfato y purificación usando columnas de resina cargada con níquel, Ni²⁺-NTA (Qiagen). El plásmido resultante pUG21, fue transformado por choque térmico (CT) en la cepa XL-1Blue (Stratagene) generando la cepa SK3234. La actividad biológica del nuevo alelo clonado *rne*Δ645-(his₆) fue confirmada por la transformación del plásmido pUG21 en la cepa SK6610 y el posterior crecimiento de los transformantes a 44 °C.

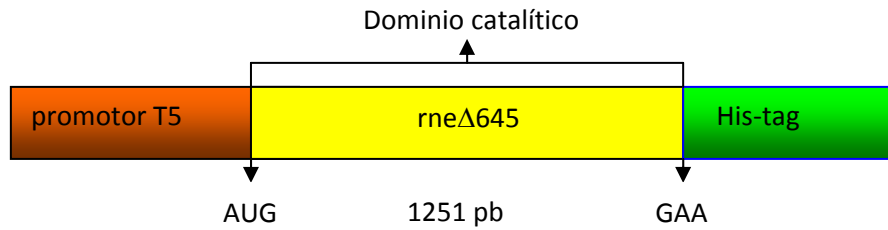


Figura 2.1 Plásmido pUG21.

2.2.10.2 pJRK1: RneΔ645

El plásmido pUGK21, el cual contiene el alelo *rneΔ645-(his₆)* fue digerido con las enzimas de restricción *Xba*I y *Xho*I. El resultante fragmento de restricción de 2.4 Kb fue aislado del gel de agarosa y purificado usando el Kit QIAquick (QIAGEN). Este fragmento fue ligado a los sitios de restricción *Sal*I y *Xba*I del plásmido de 6-8 número de copias, pWSK129 (Wang and Kushner, 1991), dando lugar a el nuevo plásmido pJRK1. Este plásmido fue transformado en SK9714 y el desplazamiento del plásmido residente dio lugar a la cepa SK3163.

Resultados

3.1 Construcción de un mutante de *E. coli* por delección del gen cromosómico *rne*.

El análisis genético de la RNasa E es complicado de realizar debido a que esta enzima es esencial para la supervivencia de *E. coli*. La RNasa E (número de acceso P21513) es una proteína con actividad endorribonucleasa de 1061 aminoácidos. Sin embargo, sólo la región N-terminal de la RNasa E parece ser necesaria para la viabilidad celular {Lopez, 1999 #315}{Ow, 2000 #4} y es la región más conservada en una gran variedad de especies bacterianas {Kaberdin, 1998 #360}. En cambio, la región C-terminal de la RNasa E, la cual no es esencial para la viabilidad de *E. coli*, está implicada en la formación del complejo multienzimático denominado degradosoma formado por las enzimas RNasa E, PNPasa, RhlB y enolasa. Los estudios genéticos hasta ahora realizados con diferentes mutantes para analizar el papel funcional *in vivo* de la RNasa E y del degradosoma son complejos de interpretar. Así por ejemplo, una forma truncada de la RNasa E (*rne* Δ 225), la cual carece de los últimos 217 aminoácidos del extremo C-terminal e incapaz de asociarse a la PNPasa para formar el degradosoma, pero con una actividad catalítica normal, fue capaz de complementar a los mutantes termosensibles *rne-1* y *rne-3071* {Claverie-Martin, 1989 #8}. Sin embargo, al poder funcionar la RNasa E *in vivo* como un dímero {Mackie, 1997 #340} {Coburn, 1999 #337}, la interpretación de los resultados obtenidos de esta complementación deben de tener en cuenta que ambos alelos, *rne-1* y el *rne-3071*, conducen a la síntesis de la RNasa E de longitud completa y con una actividad catalítica termosensible. Entonces aunque los mutantes termosensibles *rne-1* y *rne-3071* puedan ser complementados por el alelo *rne* Δ 225 a 44°C {Claverie-Martin, 1989 #8} no es posible excluir la posibilidad de que la complementación de lugar a una mezcla de dímeros conteniendo una subunidad truncada Rne Δ 225 catalíticamente activa, pero incapaz de formar el degradosoma y una subunidad de longitud completa Rne-1 o Rne-3071 catalíticamente defectuosa, pero conteniendo la región C-terminal de la RNasa E, con lo cual la PNPasa, RhlB y enolasa podrían asociarse, y por tanto, formar el degradosoma en el mutante *rne-1* o *rne-3071* complementado con *rne* Δ 225. Entonces, para el estudio del papel funcional del degradosoma de *E. coli* usando mutantes truncados de la RNasa E, no es

útil utilizar este tipo de mutantes termosensibles. Además, el análisis de mutantes de la RNasa E expresadas a partir de plásmidos son complicadas debido al alto nivel de recombinación homóloga que ocurre entre el alelo de *rne* portado en el plásmido y el gen situado en el cromosoma {Claverie-Martin, 1989 #8}.

Para evitar todos los inconvenientes anteriormente comentados, en el análisis del papel funcional *in vivo* de la RNasa E y del degradosoma, nosotros decidimos generar una cepa de *E. coli*, con una delección del gen *rne* cromosómico (*rne* Δ 1018::*bla*), en la cual se reemplazó el sitio de unión al ribosoma y los primeros 1018 aminoácidos de la proteína RNasa E por un cassette de resistencia a la ampicilina (Ap^r). Para generar una delección cromosómica del gen *rne*, se usó una modificación del método de reemplazamiento génico descrito por Hamilton y colaboradores {Hamilton, 1989 #553}. En nuestro caso particular el fragmento de DNA *Xmn*I-*Xmn*I del gen *rne* el cual contenía los 212 nucleótidos de la región 5'UTR, el sitio de unión al ribosoma, y los primeros 1018 aminoácidos de la región codificante de la RNasa E, fue reemplazado por otro fragmento de DNA portando el gen *bla*, que confiere la Ap^r, para generar el alelo *rne* Δ 1018::*bla* (Fig. 3.1). Posteriormente cointegrantes del plásmido pQLK61 (derivado del plásmido pMAK705 conteniendo el cassette *rne* Δ 1018::*bla*) en la cepa MC1061 fueron resueltos en presencia del plásmido de bajo número de copias, pQLK26 (*rne*⁺ Km^r), el cual porta una copia del alelo salvaje del gen *rne*. Varios cointegrantes resueltos fueron obtenidos y todos ellos contenían la delección del gen *rne* (*rne* Δ 1018::*bla*) insertado en el cromosoma a juzgar por los resultados del análisis mediante PCR (resultado no mostrado). El alelo *rne* Δ 1018::*bla* fue transducido dentro de la cepa derivada de la MG1693 (*thyA*715) llevando el plásmido pQLK26 (*rne*⁺ Km^r) por co-transducción con *pyrC*. Después de este paso, el alelo *recA*56 fue introducido por co-transducción para prevenir la recombinación homóloga entre la secuencia residual del *rne* en el cromosoma y aquella portada por cualquier plásmido residente.

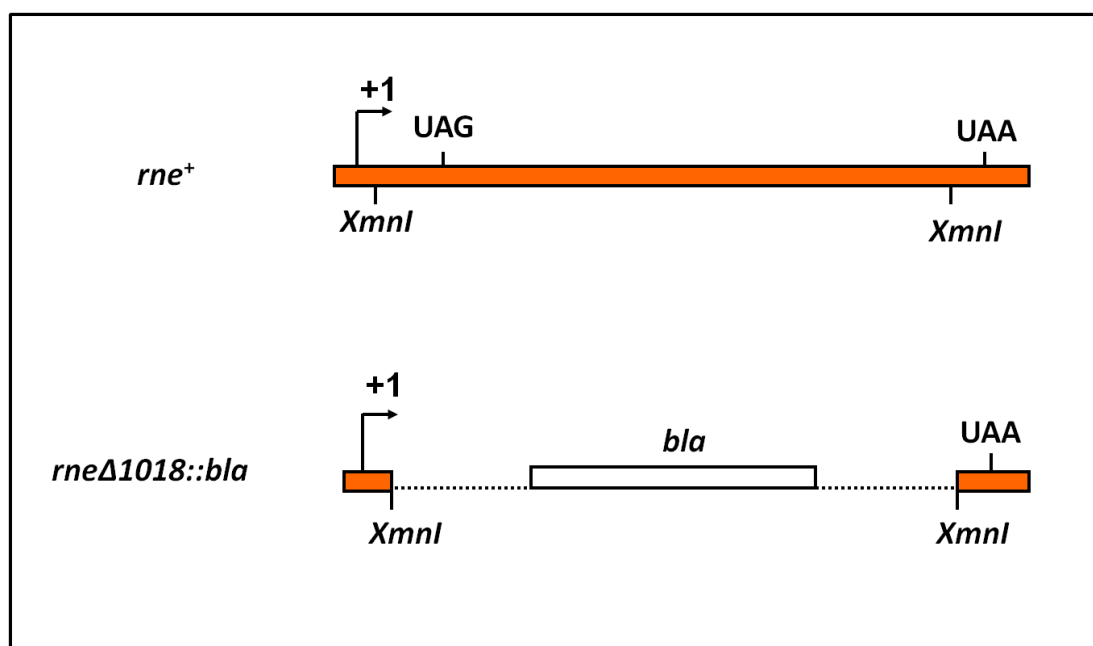


Figura 3.1. Representación esquemática de la construcción del alelo *rneΔ1018::bla*. En la parte superior se muestra la estructura del gen *rne* incluyendo el sitio de inicio de transcripción, y los codones de iniciación (AUG) y de terminación (UAA) de la traducción. La RNasa E contiene 1061 aminoácidos {Casaregola, 1994 #372} {Casaregola, 1992 #373}. En la parte inferior se muestra el alelo *rneΔ1018::bla* retiene 149 nucleótidos del 5'UTR del transcrito *rne* y el extremo 3' de la secuencia codificante, que codifica para los últimos 43 aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína. El fragmento de DNA *XmnI*-*XmnI* del gen *rne* fue reemplazado por un cassette de expresión con el gen *bla* (Ap^r) como se describe en materiales y métodos.

Mediante análisis de PCR y Southern Blot (resultados no mostrados) fue confirmado la ausencia del gen *rne* en el cromosoma de la nueva cepa SK9705 (*rneΔ1018::bla* *recA56*/pQLK26 [*rne*⁺ Km^r]). Posteriormente transformamos la cepa SK9705 con el plásmido pSBK1 (*rne*⁺ Cm^r) el cual es incompatible con el plásmido residente pQLK26 (*rne*⁺ Km^r). Los transformantes fueron crecidos en medio líquido LB suplementado con timina y cloranfenicol durante tres días para desplazar el plásmido residente y de este modo obtener la cepa SK9714 (*rneΔ1018::bla* *recA56*/pSBK1 [*rne*⁺ Cm^r]).

3.2 Introducción de mutaciones aleatorias en la región codificante del dominio catalítico de la RNasa E y selección de mutantes termosensibles.

Debido a nuestro interés en determinar los aminoácidos de la RNasa E que rigen las bases moleculares implicadas en la catálisis y especificidad por el sustrato, nosotros decidimos, mediante mutagénesis química aleatoria *in vitro*, generar mutaciones al azar en el alelo *rneΔ645-(his₆)*. El plásmido pJRK1 [*rneΔ645-(his₆)* Km^r], codifica para una versión truncada y funcional de la RNasa E, que contiene los primeros 417 aminoácidos de la región N-terminal de la RNasa E. Con el fin de generar mutaciones aleatorias dentro del dominio catalítico de la RNasa E, el plásmido pJRK1 [*rneΔ645-(his₆)* Km^r] fue expuesto al agente mutagénico hidroxilamina, que actúa específicamente sobre las citosinas, añadiéndole un hidroxilo a su grupo amino y, por tanto, generando transiciones C→T. El conjunto de plásmidos expuesto al agente mutagénico fue posteriormente electrotransformado en la cepa SK9714 (*rneΔ1018::bla recA56/pSBK1 [rne⁺ Cm^r]*) descrita anteriormente (ver apartado 3.1). Posteriormente, la incompatibilidad de plásmidos fue utilizada para desplazar el plásmido residente pSBK1 (*rne⁺ Cm^r*) por los plásmidos mutagenizados a 30°C. Mediante esta estrategia la pérdida del plásmido residente, solo podía ser realizada por aquellos plásmidos mutagenizados que soportaran la viabilidad celular a al menos 30°C. Por el contrario, aquellos plásmidos portadores de alelos mutantes de la RNasa E que codificaran para una RNasa E no funcional no serían capaces de desplazar el plásmido residente pSBK1 (*rne⁺ Cm^r*) en la cepa SK9714 (*rneΔ1018::bla recA56/pSBK1 [rne⁺ Cm^r]*). A continuación los transformantes fueron sembrados en placas de LB suplementado con timina y kanamicina e incubados a 30°C. Al día siguiente las colonias obtenidas fueron replicadas en placas e incubadas a 44°C. De tal forma que aquellas colonias capaces de crecer a 30°C, pero incapaces de crecer a 44°C fueron seleccionadas como potenciales mutantes termosensibles de la RNasa E. Los plásmidos de las colonias termosensibles seleccionadas fueron purificados y secuenciados con el fin de identificar las mutaciones en el gen *rneΔ645-(his₆)*. La secuenciación de estos plásmidos reveló cambios puntuales de nucleótidos en la secuencia del alelo *rneΔ645-(his₆)*, que provocaban cambios de un solo aminoácido en la secuencia de la proteína

truncada (Tabla 3.1). Por tanto, se seleccionaron seis mutantes puntuales termosensibles: SK3244 [*rne*Δ645/389-(*his*₆) Km^r], SK3245 [*rne*Δ645/68-(*his*₆) Km^r], SK3246 [*rne*Δ645/204-(*his*₆) Km^r], SK3247 [*rne*Δ645/264-(*his*₆) Km^r], SK3248 [*rne*Δ645/126-(*his*₆) Km^r] y SK3249 [*rne*Δ645/287-(*his*₆) Km^r].

Tabla 3. 1. Posición del nucleótido modificado, naturaleza del cambio de nucleótido y de aminoácido dentro de la región catalítica de la RNasa E de los mutantes termosensibles aislados.

Plásmido	Posición	Cambio de base	Cambio de aminoácido
pJRK7	860	TCT→T <u>T</u> T	287Ser(S)→Phe(F)
pJRK12	1165	CGT→ <u>I</u> GT	389 Arg(R)→Cys(C)
pJRK13	202	CTC→ <u>I</u> TC	68 Leu(L)→Pro(P)
pJRK21	611	CCG→C <u>T</u> G	204 Pro(P)→Leu(L)
pJRK51	378	TAT→T <u>G</u> T	126 Tyr (Y)→Cys(C)
pJRK91	791	CCG→C <u>T</u> G	264 Pro(P)→Leu(L)

Las mutaciones detectadas fueron localizadas en los diferentes subdominios del dominio catalítico de la RNasa E descritos por Callagan y colaboradores (Fig. 3.2). Para verificar que las mutaciones identificadas por secuenciación eran las únicas responsables del fenotipo termosensible observado en las cepas portadoras de dichos alelos y no a posibles mutaciones localizadas en otras regiones del plásmido, nosotros introdujimos las mismas mutaciones puntuales mediante mutagénesis dirigida *in vitro* usando el método de PCR solapante. Se usó como molde para la PCR el mismo plásmido pJRK1 [*rne*Δ645-(*his*₆) Km^r], los primers mutagénicos, que incorporan la mutación deseada y la *Pfu* DNA polimerasa (Stratagene). Los productos de PCR

llevando las mutaciones específicas fueron digeridos con las enzimas de restricción *KpnI* y *XbaI* e intercambiado con el fragmento liberado del plásmido pJRK1 [*rne* Δ 645- (*his*₆) Km^r] digerido con las mismas enzimas de restricción. Los plásmidos resultantes pJRK60 [*rne* Δ 645/389- (*his*₆) Km^r], pJRK61 [*rne* Δ 645/68- (*his*₆) Km^r], pJRK62 [*rne* Δ 645/204- (*his*₆) Km^r], pJRK63 [*rne* Δ 645/264- (*his*₆) Km^r], pJRK64 [*rne* Δ 645/126- (*his*₆) Km^r], pJRK65 [*rne* Δ 645/287- (*his*₆) Km^r] fueron transformados en SK9714 para producir las cepas SK3273 [*rne* Δ 645/389- (*his*₆) Km^r], SK3274 [*rne* Δ 645/68- (*his*₆) Km^r], SK3275 [*rne* Δ 645/204- (*his*₆) Km^r], SK3276 [*rne* Δ 645/264- (*his*₆) Km^r], SK3277 [*rne* Δ 645/126- (*his*₆) Km^r] y SK3278 [*rne* Δ 645/287- (*his*₆) Km^r] respectivamente, después de desplazar el plásmido residente pSBK1 (*rne*⁺ Cm^r).

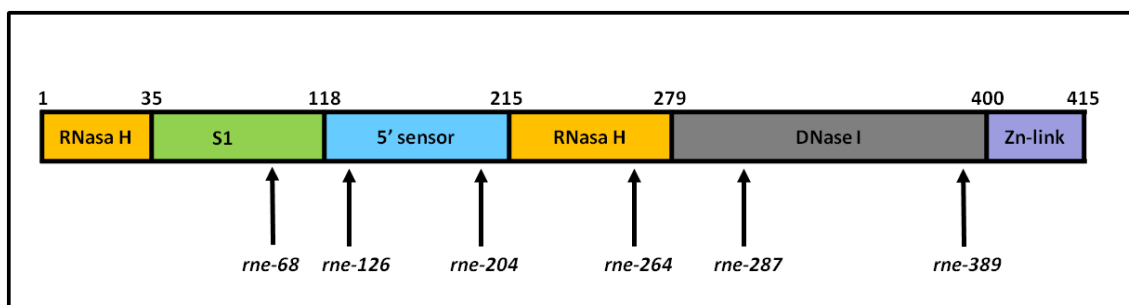


Figura 3.2. Localización de las mutaciones termosensibles. Representación esquemática del dominio catalítico mostrando los 5 subdominios identificados por análisis cristalográfico de rayos X realizado por Callagan y colaboradores {Callaghan, 2005 #250}. La localización de las mutaciones termosensibles identificadas es indicada mediante flechas. La figura no está dibujada a escala.

3.3 La mutación 204 Pro→Leu confiere termosensibilidad a la RNasa E de longitud completa.

Para analizar el efecto de estas mutaciones en un contexto más fisiológico, nosotros introdujimos las mismas mutaciones puntuales en el gen *rne*, que codifica la RNasa E nativa de *E. coli*. Mediante el método de PCR solapante generamos los alelos mutantes usando el plásmido pSBK1 (*rne*⁺ Cm^r) como molde, los primers mutagénicos y la *Pfu* DNA polimerasa (Stratagene). Los productos de PCR llevando las mutaciones específicas fueron digeridos con las enzimas de restricción *NsiI* y *PmlI* e intercambiados con el fragmento del plásmido pSBK1 (*rne*⁺ Cm^r) digerido con las

mismas enzimas de restricción. Los plásmidos pJR11 (*rne-389* Cm^r), pJRK22 (*rne-204* Cm^r), pJRK92 (*rne-264* Cm^r), pJRK14 (*rne-68* Cm^r), pJRK15 (*rne-126* Cm^r) y pJRK16 (*rne-287* Cm^r) fueron transformados en SK9705 para producir las cepas SK3250 (*rne-389* Cm^r), SK3251 (*rne-204* Cm^r), SK3252 (*rne-264* Cm^r), SK3253 (*rne-68* Cm^r), SK3254 (*rne-126* Cm^r) y SK3255 (*rne-287* Cm^r) respectivamente después de desplazar el plásmido residente pQLK26 (*rne*⁺ Km^r). Todas estas cepas fueron crecidas en medio líquido a 44°C, y sorprendentemente, sólo la cepa SK3251 (*rne-204* Cm^r) fue incapaz de crecer a 44°C (resultados no mostrados), mientras que las demás cepas fueron capaces de crecer a 44°C. Por tanto, de las seis mutaciones puntuales encontradas en el alelo *rne*Δ645-(*his*₆) sólo la mutación 204 Pro→Leu, fue capaz de conferir termosensibilidad a la RNasa E de longitud completa. Ante este sorprendente resultado, nosotros decidimos centrarnos en el análisis *in vivo* de la mutación 204 Pro→Leu contenida en la cepa SK3251 (*rne-204* Cm^r). Para construir el plásmido de copia única pJRK40 (*rne-204* Sm^r/Sp^r), un fragmento del plásmido pJRK22 (*rne-204* Cm^r) digerido con las enzimas de restricción *Sac*I y *Kpn*I conteniendo el alelo *rne-204* fue insertado en el vector pMOK40 (Sm^r/Sp^r). El plásmido pJR40 (*rne-204/203* Sp^r) fue transformado en SK9714 y después de desplazar el plásmido residente pSBK1 (*rne*⁺ Cm^r) fue transformado de nuevo con el plásmido pWSK129 (Km^r) para producir la cepa SK3260 pJR40 (*rne-204* Sm^r/Sp^r)/ pWSK129(Km^r).

3.4 Generación del alelo mutante *rne*Δ645/204 con el promotor nativo de *rne*.

Para estudiar el efecto funcional de la versión truncada RneΔ645/204 *in vivo*, se construyó el alelo termosensible *rne*Δ645/204 con el promotor nativo del gen *rne*. Este mutante fue construido mediante PCR solapante usando como molde el plásmido pMOK29 (*rne*Δ645 Cm^r), los primers mutagénicos p2.1 mut-1 y p2.1 mut-2, y la *Pfu* DNA polimerasa (Stratagene). El producto de PCR llevando las mutaciones específicas fueron digeridos con las enzimas de restricción *Kpn*I y *Xba*I y clonado en pMOK29 (*rne*Δ645 Cm^r) de tal manera que se reemplaza el fragmento parental y no mutado del gen *rne*Δ645 por el inserto portando la mutación deseada. Las mutaciones puntuales

de los alelos mutantes portados por los plásmidos resultantes fueron verificadas mediante secuenciación manual mientras que la secuencia completa del alelo mutante *rne*Δ645/204 fue verificada por secuenciación automática. El plásmido resultante pJRK23 (*rne*Δ645/204 Km^r) fue transformado en SK9714 para producir la cepa SK3270. Para construir el plásmido de copia única pJRK42 (*rne*Δ645/204 Sp^r), un fragmento del plásmido pJRK23 (*rne*Δ645/204 Km^r) digerido con las enzimas de restricción *Sac*I y *Kpn*I conteniendo el alelo *rne*Δ645/204 fue insertado en el vector pMOK40 (Sp^r) previamente linearizado con las mismas enzimas de restricción. El plásmido pJRK42 (*rne*⁻ *rne*Δ645/204 Sp^r) fue transformado en SK9714 y después de desplazar el plásmido residente pSBK1 (*rne*⁺ Cm^r) fue de nuevo transformado con el plásmido pWSK129 (Km^r) para producir la cepa SK3271 (*rne*-204/203 Sp^r)/ pWSK129(Km^r).

3.5 Selección de un alelo supresor del mutante *rne*-204.

Cuando un cultivo de la cepa termosensible SK3251 (*rne*-204 Cm^r) crecido a 37°C en LB fue diluido, sembrado en placa de LB agar e incubado a 44°C, tres colonias fueron capaces de crecer. Estas colonias capaces de crecer a la temperatura no permisiva fueron purificadas y analizadas. La secuenciación completa de la región que codifica el dominio N-terminal catalítico del alelo *rne*-204 en el plásmido pJRK22 de una de las colonias (SK3257) reveló una transversión, C→G, que provocaba el cambio del aminoácido 203 Ala(A) → Gly(G). Para confirmar que la transversión C→G era responsable de la supresión de la letalidad observada en SK3251 a 44°C, nosotros reconstruimos mediante mutagénesis dirigida la mutación *rne*-204/203 usando el plásmido pJRK22 (*rne*-204 Cm^r) como molde y creando el nuevo plásmido pJRK26 (*rne*-204/203). La transformación de pJRK26 (*rne*-204/203) en SK9705 y el posterior desplazamiento del plásmido pQLK26 (*rne*⁺ Km^r) resultó en la cepa en la cepa SK3269 (*rne*-204/203 Cm^r) cuyas propiedades fenotípicas fueron idénticas al aislado original SK3257. Para construir el plásmido de copia única pJRK42 (*rne*-204/203 Sp^r), un fragmento del plásmido pJRK24 (*rne*-204/203 Cm^r) digerido con las enzimas de restricción *Sac*I y *Kpn*I conteniendo el alelo *rne*-204/203 fue insertado en el vector

pMOK40 (Sp^r) previamente linearizado con las mismas enzimas de restricción. El plásmido pJR42 (*rne-204/203* Sp^r) fue transformado en SK9714 y después de desplazar el plásmido residente pSBK1 (*rne*⁺ Cm^r) fue transformado de nuevo con el plásmido pWSK129(Km^r) para producir las cepas SK3264 pJR42 (*rne-204/203* Sp^r)/pWSK129(Km^r).

3.6 Análisis estructural de la región-terminal de la RNasa E.

En colaboración con el Dr. B. C. Wang, del departamento de Bioquímica de la Universidad de Georgia, realizamos un análisis bioinformático de los dominios que componen la proteína truncada Rne Δ 645 (417 aminoácidos) utilizando las bases de datos de secuencias de proteínas Prodom, pFAM y COG. El resultado de este análisis indicó la existencia de dos dominios estructurales perfectamente definidos: el dominio previamente descrito de unión a RNA S1 localizado entre los aminoácidos 35-135 y un nuevo dominio localizado entre los aminoácidos 147-392. La estructura secundaria estimada presenta un índice de similitud de 51.57 (≥ 50 es considerado significativo) y consta de una serie de hélices α y hojas β alternantes conectadas mediante lazos. El posterior análisis bioinformático en 3D del plegamiento del nuevo dominio (Fig 3.3) estimó una estructura de tipo barril TIM (Branden, C 1991 Struct Biol.). Este tipo de estructura fue primero identificado como el sitio catalítico de la triosafosfato isomerasa (TIM). Si este modelo es correcto el sitio catalítico debería estar formado por alguno de aquellos residuos de aminoácidos situados en los lazos que conectan el extremo terminal de las hélices α y las hojas β localizadas corrientes abajo.

Puesto que el modelo estructural en barril TIM de la RNasa E predice una serie de ocho lazos, que podrían estar implicados en el corte de los enlaces fosfodiéster o actividad endorribonucleasa, analizamos las secuencias de estos ocho lazos. Sorprendentemente encontramos que algunas de estas regiones están mucho más conservadas que otras. El lazo seis (50% idéntico y 89% similar) y el siete (50% idéntico y 71% similar) son los más altamente conservados mientras el lazo uno (14% idéntico y 43% similar) es el menos conservado. Los aminoácidos conservados (en negrita) del lazo seis, AFQREVRL**P**S**G**GSIVIDST, están presentes en las once RNasa E homólogas,

mientras que otros aminoácidos (subrayados) del mismo lazo están conservados entre la RNasa E y la RNasa G. Casualmente la mutación del alelo termosensible *rneΔ645/287* reside en la serina del lazo seis conservada entre diferentes homólogas a la RNasa E, esto podría sugerirnos a priori un papel esencial en la función de la RNasa E. Sin embargo, cuando la misma mutación del alelo *rneΔ645/287* fue transferida a la versión completa de la RNasa E, el nuevo mutante fue viable aunque sus propiedades de crecimiento estaban ligeramente afectadas (resultado no mostrado). A pesar de que este modelo de barril TIM no muestra valiosa información estructural del sitio catalítico, no todos los residuos altamente conservados están contenidos en estos ocho lazos indicados en la figura 3.3. Así por ejemplo, la secuencia del lazo que conecta la hoja siete con la hélice α ocho (LRDDL**GGLIVDFI**) es un 69% idéntica y un 100% similar entre la RNasa E y la RNasa G de *E. coli*, mientras que los residuos marcados en negrita están conservados entre las once RNasa E homólogas.

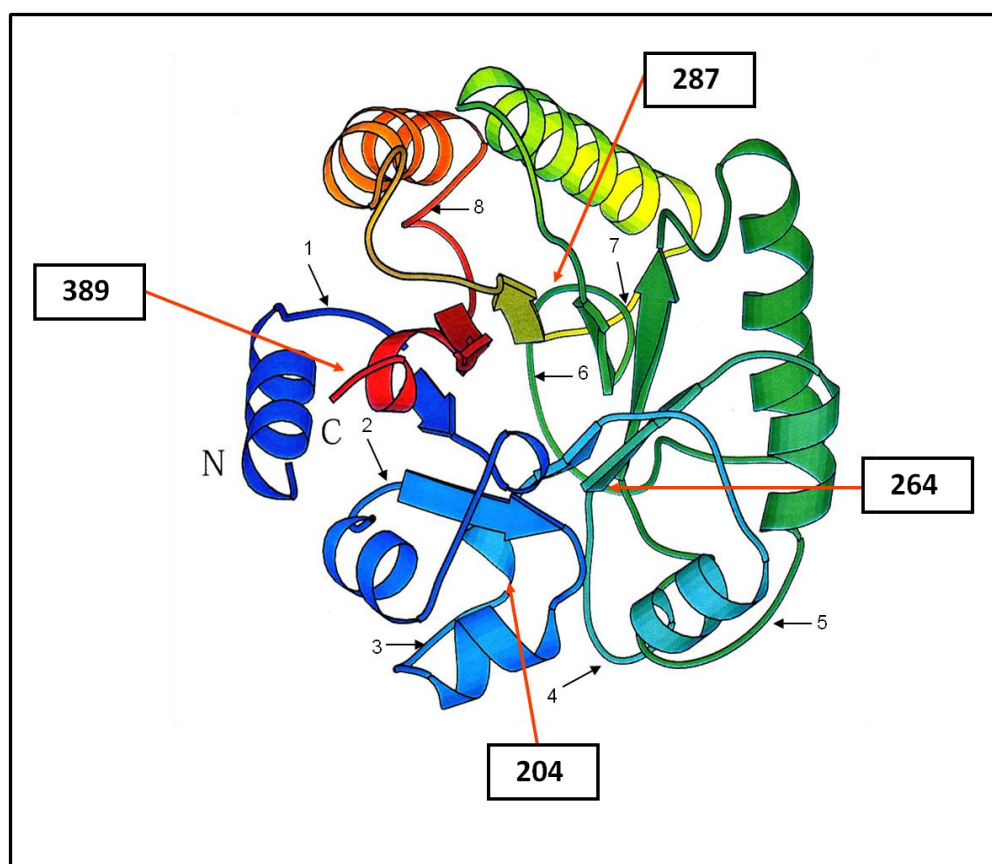


Figura 3.3. Estructura estimada tipo barril TIM de la región 147-392 de la RNasa E. Representación gráfica del modelo estructural tipo barril TIM estimado para la región 147-392 del dominio catalítico de la RNasa E derivado del análisis bioinformático usando las bases de datos de secuencias de proteína Pfam, COG y Prodoms. El extremo N-terminal comienza en el aminoácido 147, mientras el extremo C-terminal termina en el aminoácido 392 de la RNasa E. Los ocho lazos interiores que conectan las α hélices con la hojas β , localizadas corriente abajo empezando desde el extremo N-terminal, son señaladas por flechas negras. La localización de los 4 alelos termosensibles de la *rneΔ645* (*rneΔ645/204*, *rneΔ645/264*, *rneΔ645/287* y *rneΔ645/389*) cuyas mutaciones residen en esta región son indicados por flechas rojas. La figura fue realizada usando el programa MOLSCRIT.

3.7 Propiedades de crecimiento de los mutantes termosensibles de la RNasa E.

Para estudiar el efecto en el crecimiento de los cultivos de las cepas portadoras de estos alelos mutantes *rneΔ645/204* y *rne-204* en plásmidos de 6-8 copias o de una copia por célula en medio líquido, realizamos curvas de crecimiento a 37°C y 44°C. Nosotros comparamos los efectos de estos mutantes con la cepa control *rne*⁺, el mutante truncando *rneΔ645* {Ow, 2002 #17} y los mutantes termosensibles *rne-1* {Apirion, 1978 #156} y *rneΔ610* {Ow, 2000 #4}, que codifica para una proteína de 427 aminoácidos de la RNasa E fusionado a los últimos 25 aminoácidos de la región C-terminal en pauta de lectura. Los cultivos bacterianos fueron inicialmente crecidos a

30°C hasta alcanzar la fase exponencial y posteriormente fueron transferidos a baños agitadores a 37°C o a 44°C. El crecimiento de las cepas a estas temperaturas se mantuvo durante al menos 6 horas y los cultivos fueron mantenidos todo el tiempo en fase exponencial mediante dilución con medio fresco.

A 37°C la cepa 3270 (*rne*Δ645/204) muestra un crecimiento continuo, pero defectuoso, ya que posee un tiempo de generación de 63 minutos, el doble que el de la cepa control SK9714 (*rne*⁺). Además, su tasa de crecimiento es menor incluso que los mutantes SK10103 (*rne*Δ645), SK9957 (*rne*Δ610) SK3260 (*rne*-204) y SK9937 (*rne*-1). Sin embargo, a 44°C la cepa 3270 (*rne*Δ645/204) cesa su crecimiento entre los 60 y 90 minutos después de la transferencia de los cultivos de 30°C a 44°C al igual que los mutantes termosensibles SK3260 (*rne*-204) y SK9937 (*rne*-1), mientras que la cepa termosensible SK9957 (*rne*Δ610) cesa su crecimiento a los 240 minutos del cambio de temperatura. Por otro lado, el mutante termosensible *rne*-204 muestra una tasa de crecimiento similar a la cepa control SK9714 (*rne*⁺) a 37°C, mientras el mutante *rne*-1 mostró un crecimiento inferior a la cepa *rne*-204 a esta temperatura (Fig. 3.4). Sin embargo, a 44°C el mutante *rne*-204 tiene un comportamiento similar al mutante *rne*-1, ya que su crecimiento cesa a los 90 minutos. Por último, no se observó ninguna diferencia en la tasa de crecimiento del mutante revertante *rne*-204/203 a 37°C y a 44°C al compararla con la cepa control SK9714 (*rne*⁺).

Nosotros también determinamos las propiedades de crecimiento en medio líquido de las diferentes cepas llevando estos alelos en plásmidos de una copia. Para realizar esto los alelos *rne*⁺, *rne*Δ645, *rne*Δ610, *rne*Δ645/204, *rne*-1, *rne*-204 y *rne*-204/203 fueron transferidos al plásmido pMOK40 {Ow, 2000 #4}, un vector de una copia por célula resistente a la espectinomicina. Bajo estas condiciones nosotros no encontramos significantes diferencias de las propiedades de crecimiento cuando los alelos *rne*Δ645/204 y *rne*-204/203 estaban presentes en plásmidos de copia sencilla o 6-8 copias. Por el contrario, los alelos termosensibles *rne*-204 y *rne*-1 muestran un cese del crecimiento a los 120 minutos aproximadamente, cuando se expresan en un plásmido de una copia y de 90 minutos cuando estaban presentes en 8-6 copias. En cambio, el alelo *rne*Δ610 a 44°C, muestra un comportamiento contrario, ya que su

crecimiento cesaba a los 120 minutos cuando estaba presente en copia única y no a las cuatro horas como ocurría cuando estaba presente en 8-6 copias. Por tanto para el alelo *rneΔ610* la reducción del número de copias causa un cese más rápido del crecimiento al contrario de lo que ocurre para los alelos *rne-204* y *rne-1*. Por otro lado, el alelo *rneΔ645* crece más lento que el alelo salvaje *rne⁺* y no muestra prácticamente diferencias en el crecimiento a 37°C y 44°C cuando está presente en plásmido de copia sencilla, aunque llama la atención que cuando es portado en un plásmido de 6-8 copias crece más rápido a 44°C (tiempo de generación 36 min.) que a la temperatura óptima de 37°C (tiempo de generación 44 min.). Cuando el mutante truncado *rneΔ645* sólo mostraba un aumento del tiempo de generación cuando estaba presente en una copia respecto a 8-6 copias a 44°C.

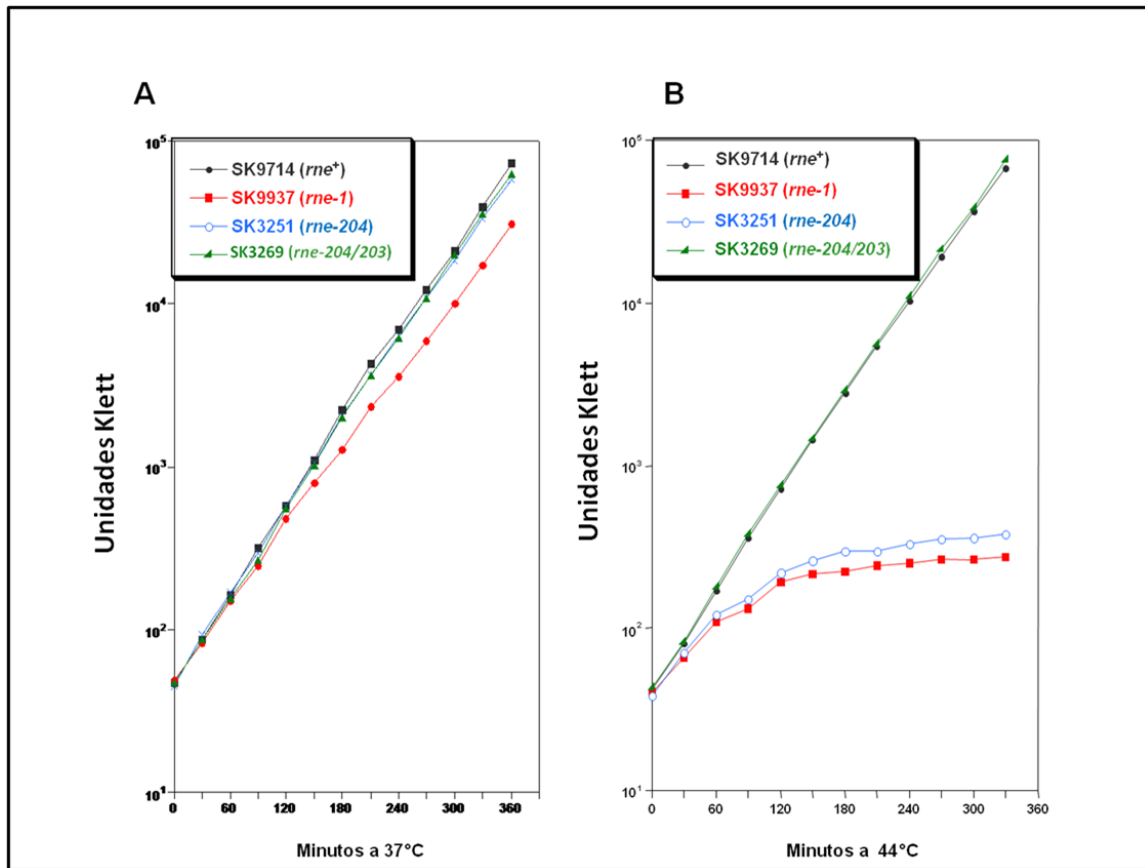


Figura 3.4. Curvas de crecimiento a 37°C (A) y 44°C (B) de las cepas llevadas los alelos *rne*⁺, *rne-1*, *rne-204* y *rne-204/203* en plásmidos de 6-8 copias por célula. Las curvas de crecimiento fueron realizadas como se describe en la sección de materiales y métodos. Círculo negro, SK9714 (*rne*⁺); cuadrado rojo, SK9937 (*rne-1*); círculo azul SK3251 (*rne-204*) y triángulo verde SK3270(*rne-Δ645/204*).

Tabla 3.2 Tiempos de generación de cepas *rneΔ1018* portando diferentes alelos de *rne* en plásmido de 1 copia por célula. Los datos representan la media de al menos tres experimentos independientes

Cepa	Genotipo ^a	Tiempo de generación (min)	
		37°C	44°C
SK10143	<i>rneΔ1018+rne⁺</i>	30	30
SK10144	<i>rneΔ1018+rne-1</i>	39	TS ^b
SK3260	<i>rneΔ1018+rne-204</i>	32	TS ^b
SK3264	<i>rneΔ1018+rne-204/203</i>	32	31
SK2685	<i>rneΔ1018+rneΔ645</i>	46	47
SK2681	<i>rneΔ1018+ rneΔ610</i>	61	TS ^b
SK3271	<i>rneΔ1018+rneΔ645/204</i>	59	TS ^c

a. Genotipo cromosómico + genotipo plasmídico

b. TS: termosensible. El crecimiento en medio líquido LB se detiene aproximadamente a los 120 minutos después de transferirlo a 44°C.

c. TS: termosensible. El crecimiento en medio líquido LB se detiene aproximadamente entre los 60 y 90 minutos después de transferirlo a 44°C.

Tabla 3.3 Tiempos de generación de diferentes cepas *rneΔ1018* portando diferentes alelos de *rne* en plásmido de 6-8 copias por célula. Los datos representan la media de al menos tres experimentos independientes.

Cepa	Genotipo ^a	Tiempo de generación (min)	
		37°C	44°C
SK9714	<i>rneΔ1018+rne⁺</i>	31	31
SK9937	<i>rneΔ1018+rne-1</i>	42	TS ^b
SK3251	<i>rneΔ1018+rne-204</i>	32	TS ^b
SK3269	<i>rneΔ1018+rne-204/203</i>	32	31
SK10103	<i>rneΔ1018+rneΔ645</i>	44	36
SK9957	<i>rneΔ1018+ rneΔ610</i>	57	TS ^d
SK3270	<i>rneΔ1018+rneΔ645/204</i>	63	TS ^c

a. Genotipo cromosómico+genotipo plasmídico

b. TS: termosensible. El crecimiento en medio líquido LB se detiene aproximadamente a los 120 minutos después de transferirlo a 44°C.

c. TS: termosensible. El crecimiento en medio líquido LB se detiene aproximadamente entre los 60 y 90 minutos después de transferirlo a 44°C.

d. TS: termosensible. El crecimiento en medio líquido LB se detiene aproximadamente a los 240 minutos después de transferirlo a 44°C.

3.8 Los alelos mutantes *rne-204* y *rneΔ645/204* son inviables a 44°C.

Las curvas de crecimiento de los alelos *rneΔ645/204* y *rne-204* mostraban un cese del crecimiento de estos mutantes a 44°C. Para demostrar si estos dos nuevos mutantes termosensibles de la RNasa E no eran viables a 44°C decidimos realizar un experimento de viabilidad celular, en el cual examinamos la habilidad de estos mutantes para formar colonias en placas de medio sólido después de crecer los cultivos de las cepas mutantes en medio líquido a 44°C. Las distintas cepas utilizadas en este experimento eran isogénicas y portaban el alelo salvaje o mutante del gen *rne* en plásmidos de una sola copia por célula. Varias diferencias fueron observadas entre los mutantes *rneΔ645/204* y *rne-204* al compararlos con la cepa control *rne⁺* y con el mutante termosensible *rne-1*, como se muestra en la figura 3.5. Se observa que la viabilidad celular de los mutantes *rneΔ645/204* y *rne-1* empieza a decrecer a los 30 minutos después de haber transferido los cultivos crecidos en un incubador a 30°C y en fase exponencial a otro incubador a 44°C. A pesar que la magnitud de la caída de la viabilidad celular para los mutantes *rneΔ645/204* y *rne-1* fueron similares (~10 veces) después de 240 minutos a 44 °C, el alelo *rneΔ645/204* presenta una tasa de disminución de la viabilidad celular más rápida que el alelo *rne-1*. El mutante *rne-204* mostraba una caída menos drástica (~5 veces) y comenzaba algo más tarde, aproximadamente a los 60 minutos después de incubarlo a la temperatura no permisiva (Fig. 3.5 B). Además, presentaba una tasa de disminución de la viabilidad celular menor que los mutantes *rneΔ645/204* y *rne-1*. Por el contrario, y como era de esperar, en la cepa control SK10143 (*rne⁺*), la capacidad de formar colonias a 44°C no fue perturbada. Curiosamente, y de forma similar a lo que había sido descrito anteriormente para el mutante termosensible *rne-3071* {Goldblum, 1981 #568}, la densidad óptica de los cultivos de SK10144 (*rne-1*) y SK3260 (*rne-204*) aumentaba después de incubarlos a 44°C hasta los 120 minutos y luego se detiene, mientras el incremento de la absorbancia de la cepa SK3271 (*rneΔ645/204*) se detiene a las 60 minutos (Fig. 3.5 A). En el caso de la cepa control SK10143 (*rne⁺*), y como era de esperar, la absorbancia aumenta de forma exponencial. Por tanto, existe una

correlación directa entre la viabilidad celular y el efecto fenotípico de crecimiento observado tanto en medio líquido como en medio sólido a 44°C para los mutantes.

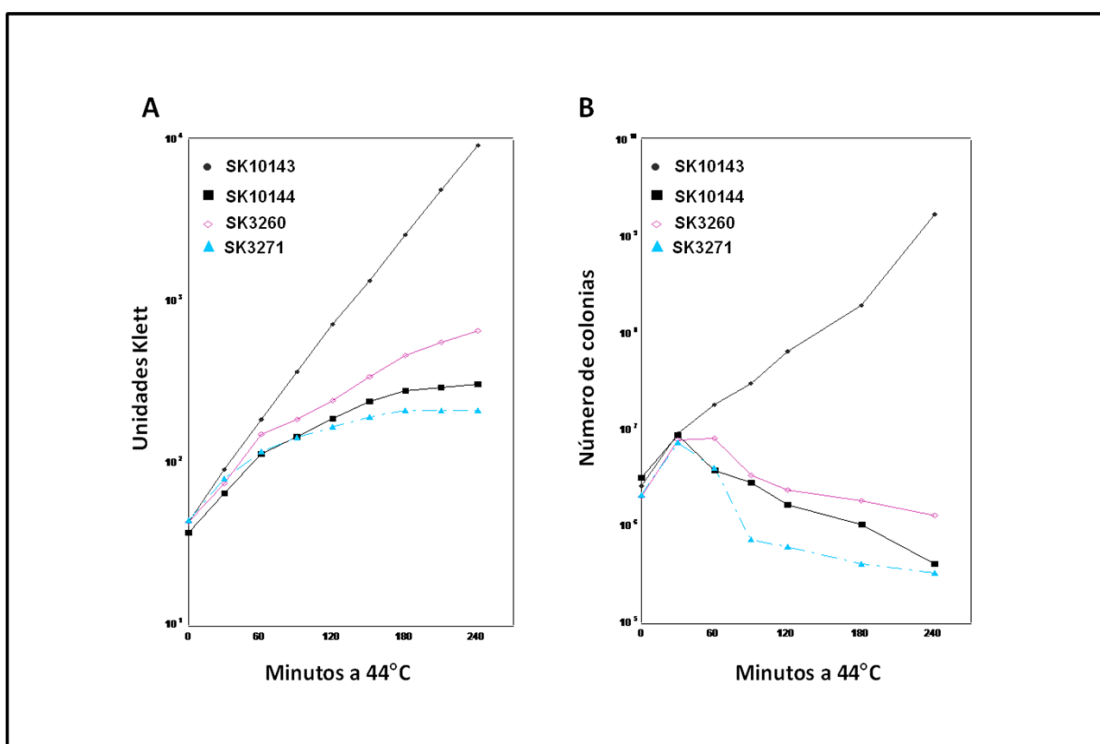


Figura 3.5. Análisis de las propiedades de crecimiento y unidades formadoras de colonias de los mutantes termosensibles *rne204* y *rneΔ645/204* a 44°C. Unidades formadoras de colonias representan el número de células presentes en el cultivo líquido crecidas previamente a 44°C durante un periodo de tiempo y capaces de formar colonias cuando son sembradas en placas de medio sólido e incubadas a una temperatura permisiva (30 °C). A) Los cultivos de SK10143 (salvaje; ●), SK10144 (*rne-1*; ■), SK3260 (*rne-204*; ◇) y SK3271 (*rneΔ645/204*; ▲) fueron crecidos a 30 °C con vigorosa agitación, en medio líquido de Luria suplementado con timina (50μg ml⁻¹), espectromicina () y kanamicina (), hasta aproximadamente 40 unidades Klett (filtro verde N° 42, 1x10⁸ células/ml). Cuando se alcanzó esta densidad, los cultivos fueron transferidos a un baño a 44 °C y en agitación. Posteriormente, cada 30 minutos los cultivos fueron diluidos con medio fresco a 44 °C. Cada 30 minutos se leyeron las unidades Klett de los cultivos y se ajustaron con el correspondiente factor de dilución para elaborar la curva de crecimiento. B) Muestras de los cultivos líquidos de SK10143 (salvaje; ●), SK10144 (*rne-1*; ■), SK3260 (*rne-204*; ◇) y SK3271 (*rneΔ645/204*; ▲) fueron obtenidas cada 30 minutos después de haber sido transferidas a 44 °C, diluidas en solución salina y sembradas en placas de LB agar suplementado con timina, espectromicina y kanamicina. Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 48 horas y luego las colonias fueron contadas con un contador electrónico de colonias.

3.9 Procesamiento del 9S rRNA en los mutantes.

La RNasa E fue inicialmente descubierta por su implicación en la maduración del 5S rRNA a partir del precursor de mayor tamaño 9S rRNA {Apirion, 1978 #156}, debido a que se observó en el mutante termosensible *rne-1* una acumulación de precursores del 5S rRNA no procesados a la temperatura no permisiva {Ow, 2000 #4}{Apirion, 1978 #156}. Se examinó si el procesamiento del 5S rRNA *in vivo* estaba afectado en los mutantes termosensibles *rne-204* y *rneΔ645/204*, y además, se determinó si los precursores del 5S rRNA eran procesados en el doble mutante revertante *rne-204/203* con igual eficiencia que en la cepa control (*rne⁺*). Para ello, se aisló RNA total en crecimiento equilibrado a 37°C y 44°C de las cepas SK10143 (*rne⁺*), SK10144 (*rne-1*), SK3260 (*rne-204*), SK3264 (*rne-204/203*), SK2685 (*rneΔ645*), SK2681 (*rneΔ610*) y SK3271 (*rneΔ645/204*) portando los diferentes alelos *rne* en plásmidos de una copia. Se realizaron Northern Blots, utilizando como sonda el oligonucleótido complementario al 5S rRNA (PB5SRNA 5'CGCTACGGCGTTTCACTTCT3'), marcado radiactivamente. Para cada una de las muestras se determinó la fracción procesada (FP) y la cantidad relativa (CR). La FP representa el valor de la fracción procesada del 5Sr RNA maduro relativo a la cantidad total de especies procesadas y no procesadas de cada muestra, mientras que la CR representa la cantidad de 5S rRNA maduro en cada una de las cepas mutantes relativo a la cantidad de 5S rRNA maduro de la cepa control SK10143 (*rne⁺*) a 37°C y 44°C (Fig. 3.6 y 3.7).

3.10 El procesamiento *in vivo* del 5SrRNA es defectuoso en el mutante *rneΔ645/204* y no es dependiente del degradosoma.

El procesamiento del 9S rRNA fue relativamente normal a 37°C en los mutantes *rneΔ645*, *rneΔ610* y *rneΔ645/204* (Fig. 3.6; carriles 2,3 y 4) cuando lo comparamos con la cepa control (*rne⁺*) (Fig. 3.6; carril 1), aunque una pequeña cantidad de largos intermediarios fueron detectados en estos mutantes truncados bajo largas exposiciones del autorradiograma. A pesar de que el mutante *rneΔ645/204* procesa el 9S rRNA relativamente normal a 37°C bajo nuestras condiciones experimentales (Fig.

3.6; carril 4), un significativo número de largos intermediarios y una menor cantidad del producto 5SrRNA maduro fueron observados *in vivo* a 44°C (Fig. 3.6; carril 8). En contraste, el procesamiento del 9S rRNA del mutante *rneΔ645* a 44°C (Fig. 3.6; carril 6) fue idéntico al observado a 37°C (Fig. 3.6; carril 2), algo menos eficiente fue el procesamiento en el mutante *rneΔ610*, aunque no tanto como el observado en el mutante *rneΔ645/204* a 44°C (Fig. 3.6; carriles 7 y 8). Los valores de la FP en los mutantes *rneΔ645*, *rneΔ645/204* y *rneΔ610* fue esencialmente idéntica a la cepa control (*rne⁺*) a 37°C (figura 1; carriles 1, 2, 3 y 4). Sin embargo, no ocurrió lo mismo a 44°C donde el mutante *rneΔ645/204* presentaba una menor capacidad de procesamiento (59% con respecto a la cepa control) e incluso una nueva especie intermediaria (Fig. 3.6 señalada con un asterisco).

3.11 El procesamiento *in vivo* del 5SrRNA es defectuoso en el mutante *rne-204* y restablecido en doble mutante revertante *rne-204/203*.

Como podemos apreciar en la figura 3.7, a 37°C el procesamiento del 9S rRNA del mutante *rne-204* es similar a la cepa control SK10143 (*rneΔ1018::bla rne⁺*) (Fig. 3.7 ; comparar carriles 1 y 3), tampoco encontramos diferencias entre las CR del 5S rRNA maduro del doble mutante revertante *rne-204/203* y el mutante *rne-204* (Fig. 3.7; comparar carriles 3 y 4). Sin embargo, el mutante *rne-1* muestra un ligero defecto en el procesamiento del 9S rRNA y una menor CR del 5S rRNA maduro al comparado con la cepa control (Fig. 3.7; comparar carriles 1 y 2). Como era de esperar, a la temperatura no permisiva de 44°C, el mutante *rne-1* presentaba una significativa disminución del 5S rRNA y una acumulación de una variedad de precursores del 5S rRNA (Fig. 3.7; carril 6). En el mutante *rne-204* se observó un defecto similar, aunque menos acusado, en la maduración del 5S rRNA a 44°C al observado en el mutante *rne-1* (Fig. 3.7; carril 7), pero sin diferencias en el patrón de intermediarios del procesamiento entre ambos mutantes. En contraste, y como esperábamos, el supresor intragénico *rne-204/203* mostró un valor de FP y una cantidad de 5S rRNA maduro similares a la cepa control *rne⁺* a 44°C.

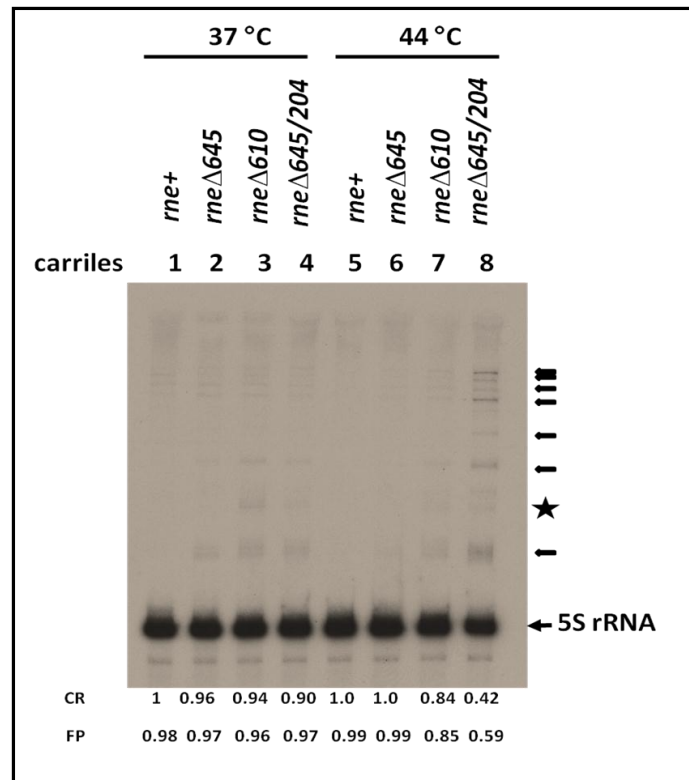


Figura 3.6 Procesamiento *in vivo* del 5S rRNA de varios mutantes truncados de la RNasa E. El RNA total fue aislado en estado equilibrado de cultivos celulares crecidos a 37°C y 44°C durante 2 horas. Equivalente cantidades de RNA (5µg) fueron cargadas en cada carril y separado mediante electroforesis en un 6% PAGE-7M urea, electrotransferido a una membrana de nylon (MSI MagnaCharge; Osmomnics) e hibridada con una sonda marcada radiactivamente en el extremo 5' (PB5SRNA; 5'-CGCTACGGCGTTTCACTTCT-3') específica para el 5S rRNA {Babitzke, 1991 #3}. En el lado izquierdo, la flecha más ancha e inferior muestra la localización del 5S rRNA maduro mientras que las bandas por encima del 5S rRNA, señaladas con flechas delgadas, son especies intermediarias procesadas. la nueva especie intermediaria identificada es señalada con un asterisco. La fracción procesada (FP) representa la fracción de 5S rRNA maduro relativo a la cantidad total de especies procesadas y no procesadas en cada cepa. La cantidad relativa (CR) es la cantidad de 5S rRNA maduro en cada mutante relativo a la cepa control (*rne*⁺). Carriles 1 y 5, SK10143(*rne*Δ1018::bla *rne*⁺); carriles 2 y 6, SK2685(*rne*Δ1018::bla *rne*Δ645); carriles 3 y 7, SK2681(*rne*Δ1018::bla *rne*Δ610) y carriles 4 y 8 SK3271 (*rne*Δ1018::bla *rne*Δ645/204).

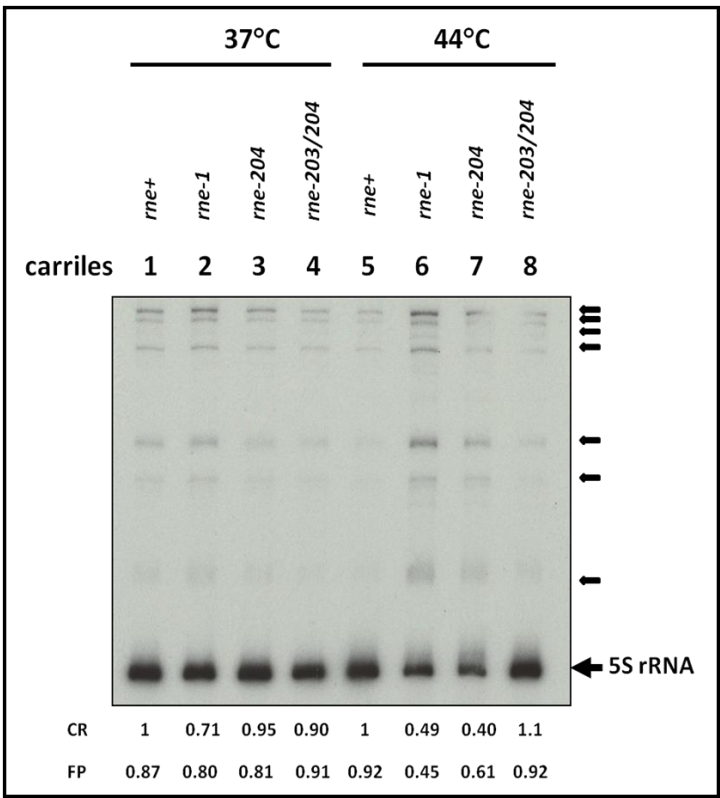


Figura 3.7 Procesamiento *in vivo* del 5S rRNA de varios mutante de la RNasa E. El RNA total fue obtenido de cultivos celulares crecidos a 37°C y 44°C durante 2 horas. Equivalente cantidades de RNA (5µg) total en estado equilibrado fue separado mediante electroforesis en cada carril de un 6% PAGE-7M urea, electransferido a una membrana de nylon (MSI MagnaCharge; Osmomnics) e hibridada con una sonda marcada radiactivamente en el extremo 5' (PB5SRNA; 5'-CGCTACGGCGTTTCACTTCT-3') específica para el 5S rRNA {Babitzke, 1991 #3}. En el lado izquierdo, la flecha más ancha muestra la localización del 5S rRNA maduro mientras que las bandas por encima del 5S rRNA son intermediarios procesados. La fracción procesada (FP) representa la fracción de 5S rRNA maduro relativo a la cantidad total de especies procesadas y no procesadas en cada cepa. La cantidad relativa (CR) es la cantidad de 5S rRNA maduro en cada mutante relativo a la cepa control (*rne+*). Carril 1 y 5, SK10143(*rneΔ1018::bla rne+*); carril 2 y 6, SK10144 (*rneΔ1018::bla rne-1*); carril 3 y 7, SK3260 (*rneΔ1018::bla rne-204*) y carril 4 y 8 SK3264 (*rneΔ1018::bla rne-204/203*).

3.12 Análisis del Procesamiento de t-RNA en los mutantes de la RNasa E.

En 1981 Ray y Apirion {Ray, 1981 #139} observaron por primera vez una acumulación de precursores de tRNA a la temperatura no permisiva en un mutante termosensible de la RNasa E. Varias líneas de investigación han demostrado que el procesamiento del extremo 5' por la RNasa P requiere un corte inicial en el extremo 3' llevado a cabo por la RNasa E {Ow, 2002 #17}. Además, ha sido demostrado que la RNasa E es requerida para catalizar la conversión de algunos transcritos policistrónicos

de tRNA en pre-tRNAs que posteriormente sufren un adicional procesamiento por la RNasa P y varias 3'-exonucleasas (RNasa II, RNasa BN, RNasa D, RNasa PH, RNasa T y PNPasa) {Li, 1996 #187} {Li, 2002 #172}{Ow, 2002 #17}. De hecho, se ha sugerido que el corte inicial de la RNasa E es esencial para la maduración de la mayoría o todos los tRNAs {Ow, 2002 #17}. Por tanto, se analizó el procesamiento *in vivo* de diferentes tRNAs en las cepas SK10143 (*rne*⁺), SK2685 (*rne*Δ645), SK2681 (*rne*Δ610), SK3271 (*rne*Δ645/204), SK10144 (*rne*-1), SK3260 (*rne*203) y SK3264 (*rne*203/204). Para ello se aisló RNA total de las cepas crecidas inicialmente a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial y luego fueron transferidas a 37°C o 44°C durante 2 horas. Mediante análisis de Northern blot se estudió el nivel de procesamiento de varios tRNAs, incluyendo tres tRNAs (tRNA^{His}, tRNA^{Pro} y tRNA^{Cys}) derivados de transcritos policistrónicos y un tRNA monocistrónico (tRNA^{Asn}) a las diferentes temperaturas y se comparó con la cepa control SK10143 (*rne*⁺). Estos tRNAs fueron elegidos porque representan las tres clases de tRNAs descritas por Ow y Kushner {Ow, 2002 #17} basado en el nivel de eficiencia del procesamiento. La clase I representa aquellos tRNAs que son procesados eficientemente, de tal manera que en crecimiento equilibrado entre el 95-99% del precursor del tRNA se encuentra en forma madura en la cepa salvaje (por ejemplo, tRNA^{Asn}). La clase 2 representa aquel grupo de tRNAs que son procesados ineficientemente de tal forma que entre un 28-30% del precursor del tRNA existe en la forma madura (por ejemplo, tRNA^{His} y tRNA^{Cys}). Además, *cysT* y *hisR* son genes únicos. La tercera clase representa aquellos tRNAs que fueron procesados con un nivel de eficiencia intermedio (por ejemplo, tRNA^{Pro}).

En cuanto al procesamiento de tRNA^{Pro} por las cepas SK10143 (*rne*⁺) y SK2685 (*rne*Δ645) no se observan diferencias en cuanto a los valores de la fracción procesada (PF) a 37°C y 44°C (Fig. 3.8). Sin embargo, significantes cantidades de intermediarios no procesados fueron observados en las cepas SK2681 (*rne*Δ610) y SK3271 (*rne*Δ645/204) a 44°C. Además, a 37°C se puede observar una reducción de la PF del mutante *rne*Δ645/204. En el caso del tRNA^{Asn} (Fig. 3.8), hay cuatro independiente transcritos cada uno conteniendo entre 9 y 10 nucleótidos extra en el extremo 5' pero con longitudes variables en el extremo 3' (*asnT*, 230 nt; *asnW*, 210 nt; *asnU* y *asnV*,

120 nt). En las cepas SK2681 (*rneΔ610*) y SK3271 (*rneΔ645/204*) había una acumulación de pre-tRNA^{Asn} a 44°C y no hay diferencias en cuanto a las especies procesadas por la RNasa E en su extremo 3'. En contraste, en las cepas SK10143 (*rne*⁺) y SK2685 (*rneΔ645*) no se aprecian precursores y el tRNA es completamente procesado a 37°C y 44°C. Sin embargo, al igual que en el caso del tRNA^{Pro}, el mutante *rneΔ645/204* es más defectivo en la maduración del tRNA^{Asn} que el mutante termosensible *rneΔ610* a juzgar por su valor de PF. En el mutante *rneΔ645/204* y *rneΔ610* solamente se acumulan los pre-tRNA^{Asn} que contiene los extremo 3' inmaduros, es decir, especies de (220, 200 y 110). El procesamiento del tRNA^{Asn} en el mutante *rneΔ645/204* se aprecia una especie de 85 nt la cual contiene el extremo 5' no procesado (Fig 3.8 marca con asterisco). Esto puede ser a una disminución de la actividad de la RNasa P en la célula debido a un fallo en el procesamiento de la subunidad M1 RNA de la RNasa P, relacionada con la inactividad de la RNasa E a la temperatura no permisiva.

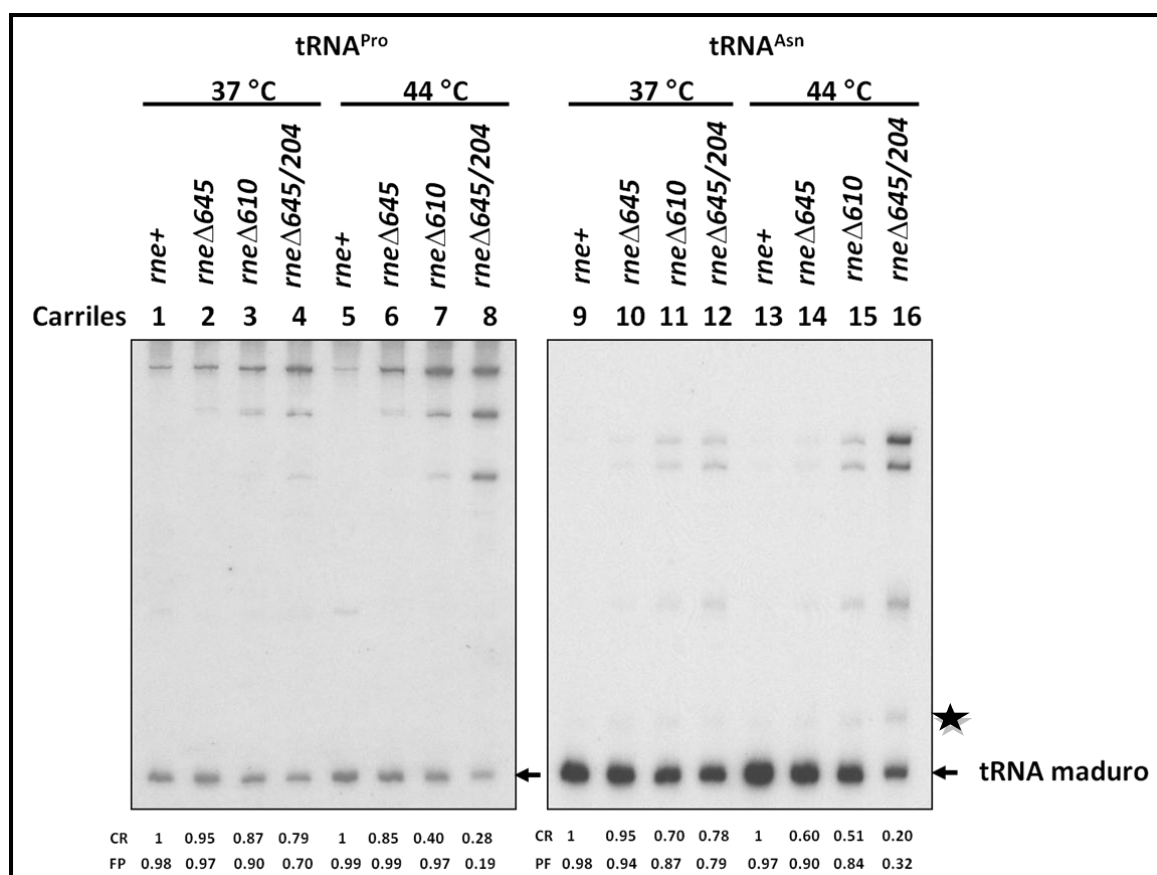


Figura 3.8 Análisis de la maduración de los tRNA^{Pro} y tRNA^{Asn} en varios mutantes de la RNasa E. RNA total de varias cepas fue aislado después de que las cepas fueran transferidas a 37°C o 44°C durante 120 minutos como se describe en la sección de materiales y métodos. La cantidad de 5μgr de RNA total fue cargada en cada carril de un gel de poliacrilamida al 8% y 7 M de urea. Después de la transferencia, la membrana fue hibridada con oligonucleótidos de DNA marcados radiativamente en el extremo 5' y complementarios a los tRNA^{Pro} y tRNA^{Asn} maduros. Los RNA Las flechas indican los tRNAs maduros. CR (cantidad realtiva) indica la cantidad de tRNA con respecto la cantidad de la cepa SK10143 (*rne*⁺). PF (fracción procesada) indica la fracción de tRNA maduro relativa a la cantidad total de tRNA maduro e inmaduro. Todos los alelos están en plásmidos de copia sencilla en una cepa con la deleción cromosómica *rneΔ1018::bla*. Carriles 1, 5, 9 y 13, SK10143 (*rne*⁺); carriles 2, 6, 10 y 14, SK2685 (*rne*Δ645); carriles 3, 7, 11 y 15, SK2681 (*rne*Δ610) y carriles 4, 8, 12 y 16 SK3271 (*rne*Δ645/204).

El procesamiento tRNA^{His} se observa que no es tan eficiente en la cepa SK10143 (*rne*⁺) como ocurría con tRNA^{Pro} y tRNA^{Asn}. En este caso, en todos los mutantes truncados se observa una acumulación de especies precursores tanto a 37°C como a 44°C, aunque son más significativas estas especies precursores en las cepas SK2681 (*rne*Δ610) y SK3271 (*rne*Δ645/204) con valores de PF de 0.03 y 0.02 respectivamente. El procesamiento del tRNA^{Cys} fue similar al procesamiento del tRNA^{His}. Se observa una baja eficiencia del procesamiento todas las cepas, pero más acusada en SK2681

(*rneΔ610*) y SK3271 (*rneΔ645/204*) a 37°C y 44°C. Por tanto parece existir una correlación directa entre crecimiento celular y eficiencia del procesamiento de los tRNAs.

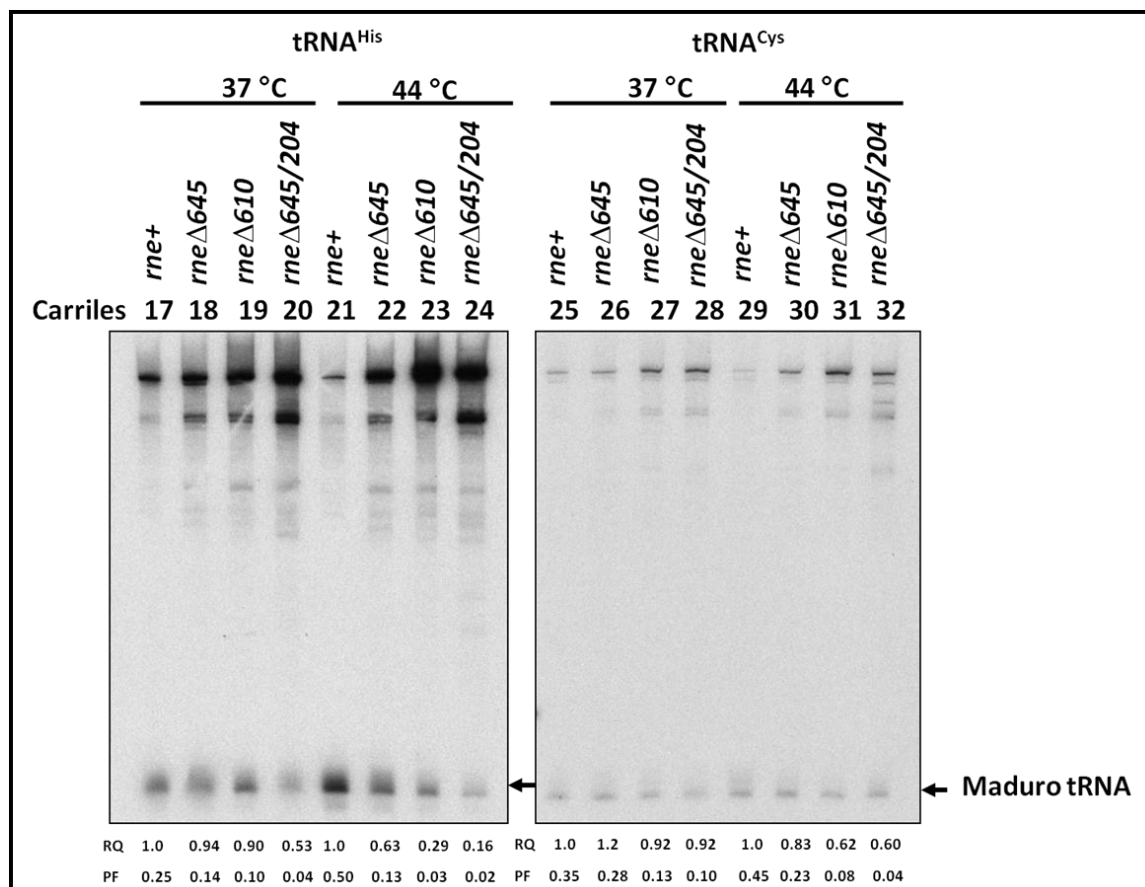


Figura 3.9. Análisis de la maduración de los tRNA^{Cys} y tRNA^{His} en varios mutantes de la RNasa E. RNA total de varias cepas fue aislado después de que las cepas fueran transferidas a 37°C o 44°C durante 120 minutos como se describe en la sección de materiales y métodos. La cantidad de 5μgr de RNA total fue cargada en cada carril de un gel de poliacrilamida al 8% y 7 M de urea. Después de la transferencia, la membrana fue hibridada con oligonucleótidos de DNA marcados radiactivamente en el extremo 5' y complementarios a los tRNA^{Cys} y tRNA^{His} maduros. Los RNA Las flechas indican los tRNAs maduros. PF (fracción procesada) indica la fracción de tRNA maduro relativa a la cantidad total de tRNA maduro e inmaduro. CR (cantidad realtiva) indica la cantidad de tRNA con respecto a la cantidad de la cepa SK10143 (*rne*⁺). Todos los alelos están en plásmidos de copia sencilla en una cepa con la delección cromosómica *rneΔ1018::bla*. Carriles 17,21, 25 y 29 SK10143 (*rne*⁺); carriles 18, 22, 26 y 30 SK2685 (*rneΔ645*); carriles 19, 23, 27y 31 SK2681 (*rneΔ610*) y carriles 20, 24, 28 y 32, SK3271 (*rneΔ645/204*).

Como esperábamos, la cepa SK10144 (*rne-1*) muestra un defecto parcial en el procesamiento de los tRNA^{Pro}, tRNA^{Asn}, tRNA^{His} y tRNA^{Cys} a 37°C como se puede observar por sus valores de PF (Fig. 3.10 y 3.11). Sin embargo, la cepa SK3260 (*rne-204*)

muestra una tasa de procesamiento similar a la cepa control SK10143 (*rne*⁺) a 37°C. Sin embargo, a 44°C se observa una disminución del nivel de procesamiento en los mutantes termosensibles, pero ligeramente más acusada en el mutante *rne-1* con respecto al mutante *rne-204*. En contraste, el doble mutante supresor intragénico *rne-204/203* presenta unos niveles de procesamiento de todos los tRNAs analizados similares a la cepa control SK10143 (*rne*⁺) a 37°C y 44°C. Al igual que ocurre con los mutantes de las versiones truncadas de la RNasa E, existe una correlación directa entre crecimiento celular y eficiencia del procesamiento de los tRNAs.

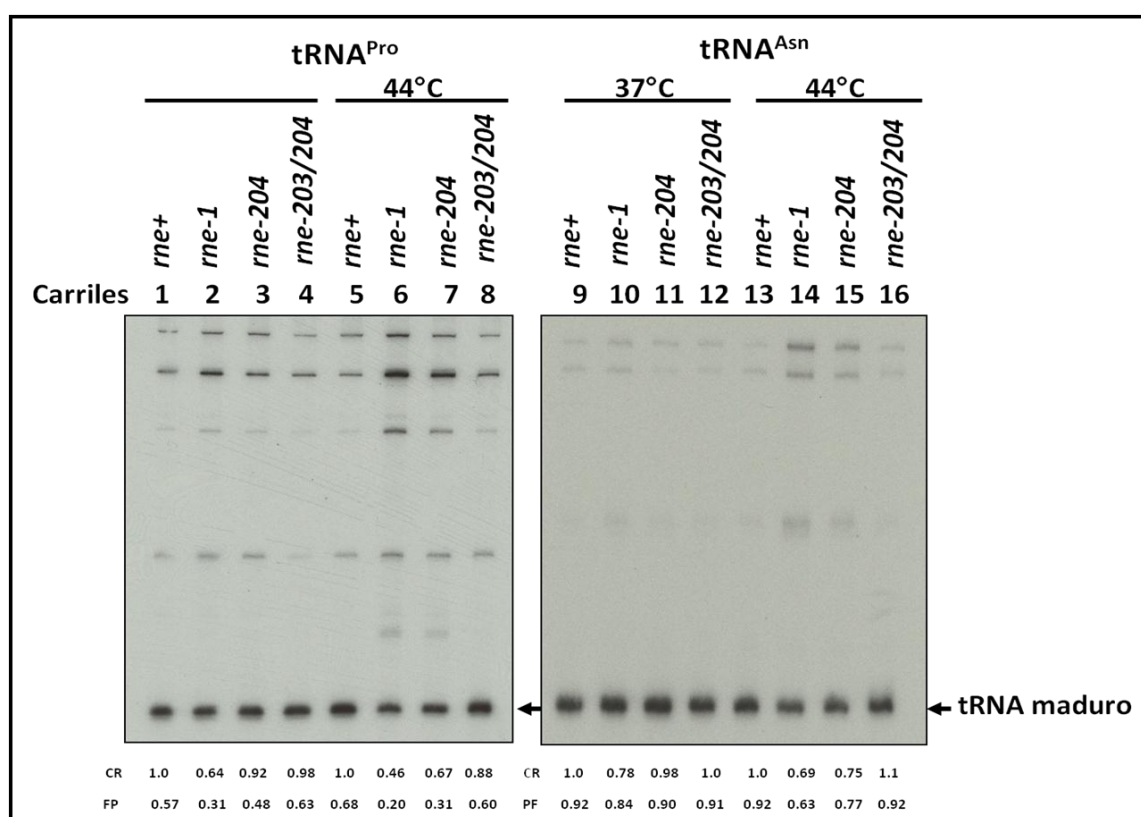


Figura 3.10. Análisis de la maduración de los tRNA^{Pro} y tRNA^{Asn} en varios mutantes de la RNasa E. RNA total de varias cepas fue aislado después de que las cepas fueran transferidas a 37°C o 44°C durante 120 minutos como se describe en la sección de materiales y métodos. La cantidad de 5 µg de RNA total fue cargada en cada carril de un gel de poliacrilamida al 8% y 7 M de urea. Después de la transferencia, la membrana fue hibridada con oligonucleótidos de DNA marcados radiactivamente en el extremo 5' y complementarios a los tRNA^{Pro} y tRNA^{Asn} maduros. Los RNA Las flechas indican los tRNAs maduros. CR (cantidad relativa) indica la cantidad de tRNA con respecto a la cantidad de la cepa SK10143 (*rne*⁺). PF (fracción procesada) indica la fracción de tRNA maduro relativa a la cantidad total de tRNA maduro e inmaduro. Todos los alelos están en plásmidos de copia sencilla en una cepa con la deleción cromosómica *rneΔ1018::bla*. Carriles 1, 5, 9 y 13, SK10143 (*rne*⁺); carriles 2, 6, 10 y 14, SK10144(*rne-1*); carriles 3, 7, 11 y 15, SK3260 (*rne-204*) y carriles 4, 8, 12 y 16, SK3264 (*rne-203/204*).

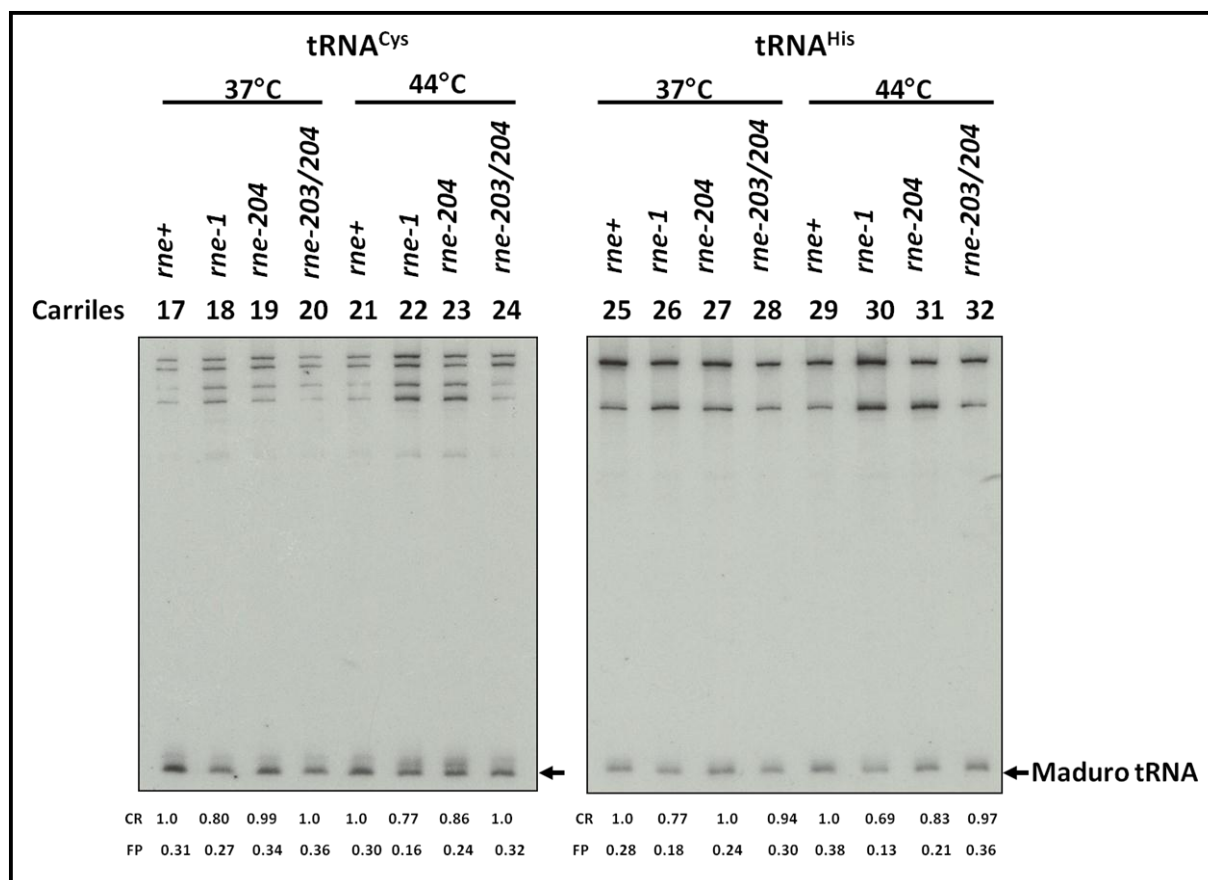


Figura 3.11 Análisis de la maduración de los tRNA^{Cys} y tRNA^{His} en varios mutantes de la RNasa E. RNA total de varias cepas fue aislado después de que las cepas fueran transferidas a 37°C o 44°C durante 120 minutos como se describe en la sección de materiales y métodos. La cantidad de 5 µg de RNA total fue cargada en cada carril de un gel de poliacrilamida al 8% y 7 M de urea. Después de la transferencia, la membrana fue hibridada con oligonucleótidos de DNA marcados radiactivamente en el extremo 5' y complementarios a los tRNA^{Cys} y tRNA^{His} maduros. Las flechas indican los tRNAs maduros. PF (fracción procesada) indica la fracción de tRNA maduro relativa a la cantidad total de tRNA maduro e inmaduro. CR (cantidad realtiva) indica la cantidad de tRNA con respecto la cantidad de la cepa SK10143 (*rne*⁺). Todos los alelos están en plásmidos de copia sencilla en una cepa con la deleción cromosómica *rneΔ1018::bla*. Carriles 17,21,25 y 29 SK10143 (*rne*⁺); carriles 18,22,26 y 30 SK10144(*rne*⁻¹); carriles 19,23,27 y 31 SK3260 (*rne*⁻²⁰⁴) y carriles 20,24,28 y 32, SK3264 (*rne*^{-203/204}).

3.13 Análisis de la regulación de la síntesis de la RNasa E en los mutantes *rne-204* y *rneΔ645/204*.

La autorregulación de los niveles de la proteína RNasa E es mediada por un corte específico de secuencia realizado por la misma RNasa E dentro de la región 5'-UTR de su propio transcrito *rne* {Jain, 1995 #46} {Diwa, 2000 #40} provocando una rápida degradación del transcrito. Por tanto, defectos en la actividad de la RNasa E deberían de afectar a la autorregulación al incrementar la estabilidad del transcrito *rne*. Esto resulta en un aumento de los niveles intracelulares de la proteína RNasa E {Ow, 2000 #4}. Para comprobar si la capacidad de autorregular la expresión de la RNasa E estaba alterada en los mutantes *rne-204* y *rneΔ645/204*, nosotros realizamos un análisis cuantitativo mediante western blot de los niveles de RNasa E a 37°C y 44°C en cepas llevando los alelos, *rne*⁺, *rne-1*, *rne-204*, *rne-204/203*, *rneΔ645*, *rneΔ610* y *rneΔ645/204* en plásmidos de una copia o de 6-8 copias por célula. (Fig. 3.12, 3.13, 3.15 y 3.16) Además, estudiamos si la autorregulación de la expresión de la RNasa E a 44°C era restablecida en el doble mutante revertante, *rne-204/203* (Fig. 3.15 y 3.16)

3.14 El alelo *rneΔ645/204* no es autorregulado.

Los alelos *rneΔ645*, *rneΔ610* y *rneΔ645/204* contienen una región 5'-UTR idéntica a la cepa salvaje con lo cual sus niveles de expresión podrían ser regulados por la acción de las versiones truncadas mutadas de la RNasa E, que estos alelos codifican. Al comparar los niveles de expresión de estos mutantes truncados con la cepa salvaje se observa que la autorregulación está afectada tanto a 37°C como a 44°C (Fig. 3.12 y 3.13). A 37°C observamos una pérdida de la autorregulación de los mutantes *rneΔ645*, *rneΔ610* y *rneΔ645/204* ya que los niveles de expresión en estos mutantes truncados aumentan entre 10 y 5 veces cuando se expresan desde plásmidos de una copia (Fig. 3.12) y de entre 15 y 10 cuando se expresan desde plásmidos de 6-8 copias con respecto a los niveles en la cepa salvaje (Fig. 3.13). No se

observan diferencias importantes de expresión entre los alelos mutantes *rneΔ645* y *rneΔ610* a 37°C ni a 44°C cuando son expresados en plásmido de una copia (Fig. 3.12; comparar carriles 2 y 3), aunque cuando son expresados en plásmidos de 6-8 copias a 37°C se observa un incremento de 1.26 veces los niveles de RneΔ610 con respecto a RneΔ645 (Fig. 3.13; comparar carriles 2 y 3). Por el contrario, los niveles de RneΔ645/204 son 2 veces inferiores a 37°C (Fig. 3.12; comparar carriles 2 y 4) y aproximadamente 7 veces inferiores a 44°C con respecto a RneΔ645 cuando son expresados en plásmido de una copia (Fig 3.12; comparar carriles 2 y 4). Un resultado inesperado en este experimento fue la disminución drástica de la expresión de RneΔ645/204 a 44°C (Fig. 3.12 y 3.13 carril 8).

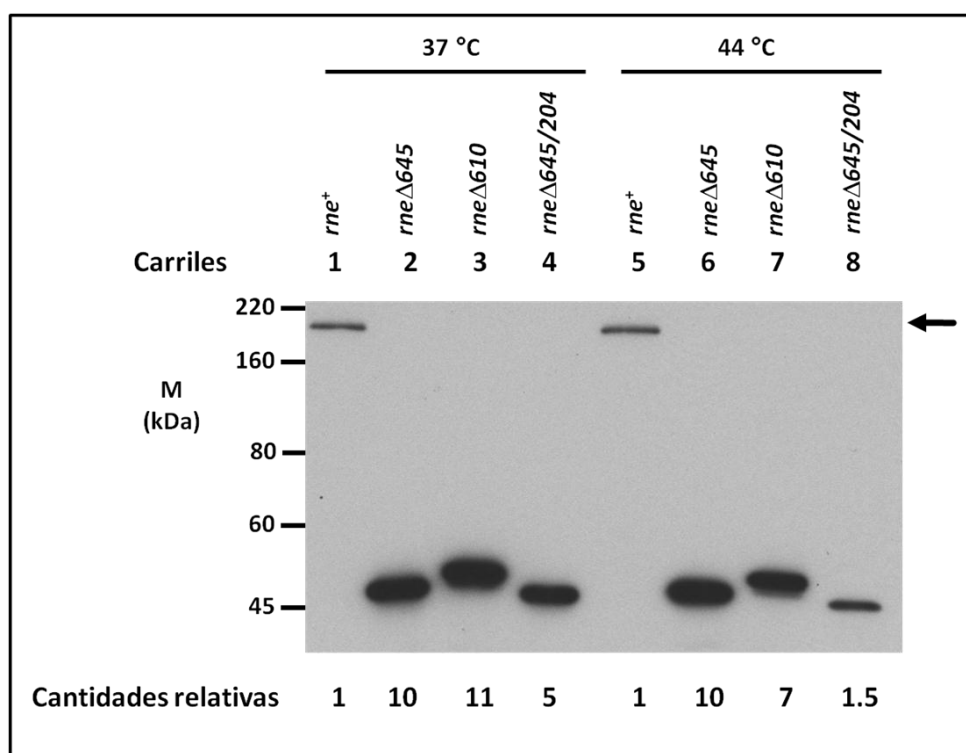


Figura 3.12. Análisis de los niveles intracelulares de la RNasa E en varias cepas mediante western blot. Los extractos de proteína total fueron aislados de cultivos crecidos exponencialmente a 37°C o cultivos crecidos primero a 30°C y luego transferidos a 44°C durante 2 horas. La RNasa E fue detectada con el anticuerpo RNasa E-MAP dirigido a los primeros 20 aminoácidos de la proteína y fue detectado usando el ELC plus system (GE Healthcare). Los western blot fueron escaneados y cuantificados usando un Storm 840 Phosphorimager. La flecha del margen derecho indica la versión de longitud completa de la RNasa E. La cantidad relativa de RNasa E en cada cepa y a cada temperatura es referida la cepa salvaje control *rne*⁺. Todos los alelos fueron portados en plásmidos de una copia en cepas que llevan el alelo *rne*Δ1018::*bla* en el cromosoma. El marcador de peso molecular de proteínas es indicado en la izquierda. Carriles 1 y 4, SK10143 (*rne*⁺); Carriles 2 y 5, SK2685 (*rne*Δ645); Carriles 3 y 6, SK2681 (*rne*Δ610); Carriles 4 y 8 SK3271(*rne*Δ645/204).

Para averiguar si este descenso significativo de la expresión de RneΔ645/204 a 44°C se debía a una disminución de su tasa de transcripción, realizamos un Northern blot con muestras de RNA total aisladas de las cepas SK10143(*rne*Δ1018::*bla rne*⁺), SK2685(*rne*Δ1018::*bla rne*Δ645), SK2681(*rne*Δ1018::*bla rne*Δ610) y SK3271(*rne*Δ1018::*bla rne*Δ645/204) crecidas a 44°C durante 2 horas y en crecimiento equilibrado. Para nuestra sorpresa observamos una relación inversa entre el nivel de transcrito y expresión de RNasa E en los mutantes truncados *rne*Δ645, *rne*Δ610 y *rne*Δ645/204 a 44°C. Como se puede apreciar claramente en la figura 3.14, hay un incremento llamativo del mRNA del alelo *rne*Δ645/204 en estado estacionario a 44°C

muy superior al *rneΔ610* y *rneΔ645*. Por tanto, esta disminución de la expresión de *RneΔ645/204* a 44°C no se debe a una reducción de la transcripción.

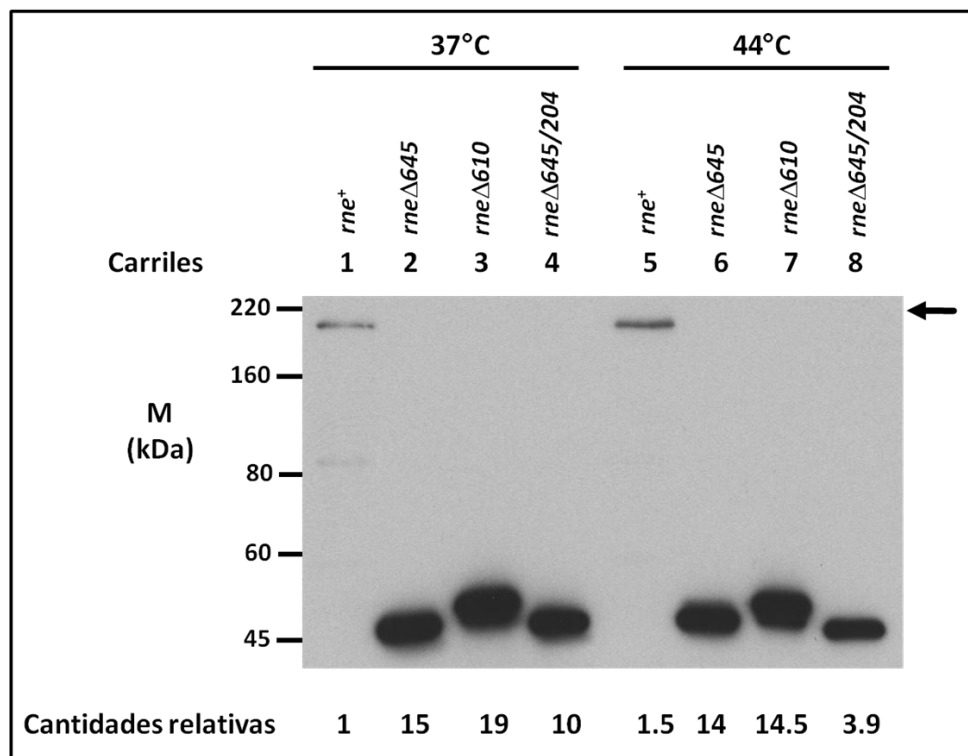


Figura 3.13 Análisis de los niveles intracelulares de la RNasa E en varias cepas mediante western blot. Los extractos de proteína total fueron aislados de cultivos crecidos exponencialmente a 37°C o cultivos crecidos primero a 30°C y luego transferidos a 44°C durante 2 horas. La RNasa E fue detectada con el anticuerpo RNasa E-MAP dirigido a los primeros 20 aminoácidos de la proteína y fue detectado usando el ELC plus system (GE Healthcare). Los western blot fueron escaneados y cuantificados usando un Storm 840 Phosphorimager. La flecha del margen derecho indica la versión de longitud completa de la RNasa E. La cantidad relativa de RNasa E en cada cepa y a cada temperatura es referida la cepa salvaje control *rne⁺*. Todos los alelos fueron portados en plásmidos de 6-8 copias en cepas que llevan el alelo *rneΔ1018::bla* en el cromosoma. El marcador de peso molecular de proteínas es indicado en la izquierda. Carriles 1 y 4, SK9714 (*rne⁺*); Carriles 2 y 5, SK10103 (*rneΔ645*); Carriles 3 y 6, SK9957(*rneΔ610*); Carriles 4 y 8 SK3270, (*rneΔ645/204*)

Estos resultados indican que la región C-terminal está implicada de algún modo en la autorregulación. Debido a que estos mutantes truncados presentan la misma región 5'UTR que la cepa salvaje, la desregulación puede deberse a una reducción de la capacidad de la RNasa E para cortar en la región 5'UTR por la ausencia de la región C-terminal en las versiones truncadas de la RNasa E *in vivo*.

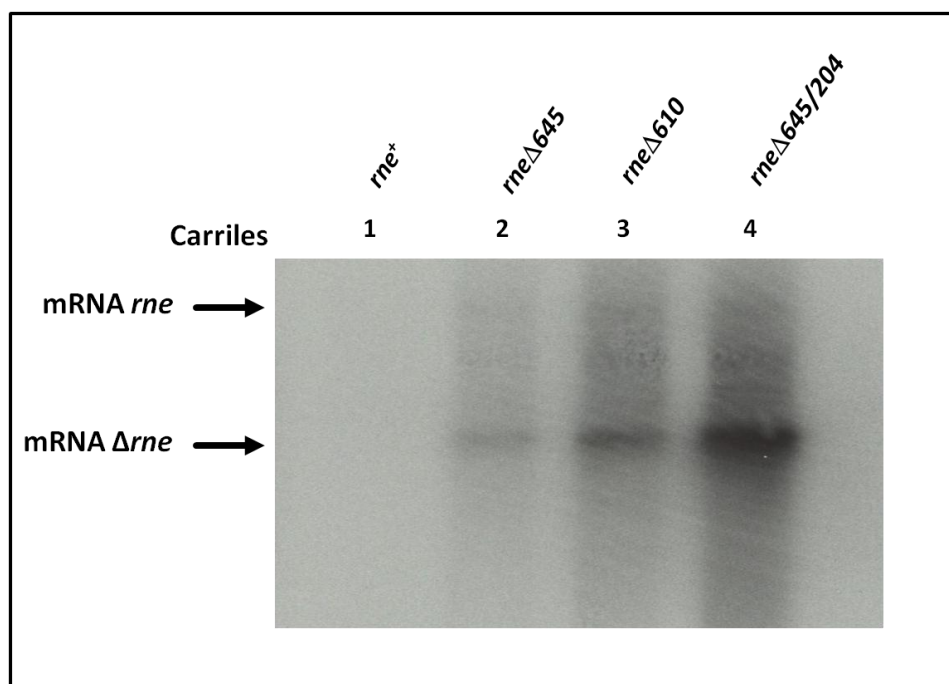


Figura 3.14 Análisis del nivel de mRNA *rne* de las diferentes RNasa E mutantes. RNA total fue extraído de células crecidas a 44°C y en crecimiento equilibrado. Igual cantidad de RNA total (5μg) fue cargada en cada carril de un gel de agarosa al 1.2%. Northern blot fue realizado como se describe en materiales y métodos usando una sonda de PCR marcada con ³²P, la cual incluye todo el dominio N-terminal catalítico. Las flechas indican la localización de la bandas correspondiente al mRNA de la RNasa E completa y las versiones truncadas.

3.15 La autorregulación es alterada en el mutante *rne-204* y restaurada en el doble mutante revertante a 44°C.

Cuando examinamos la autorregulación del mutante *rne-204* y del doble mutante revertante *rne-204/203* a 37°C y 44°C comparándola con el mutante termosensible *rne-1*, previamente descrito, y la cepa salvaje encontramos varias diferencias (Fig. 3.15 y 3.16). Al contrario del mutante *rne-1*, el mutante *rne-204*, no muestra diferencias del nivel de expresión con respecto a la cepa salvaje a 37°C. En cambio a 44°C se observa una pérdida de la autorregulación similar a la que ocurre en el mutante *rne-1*.

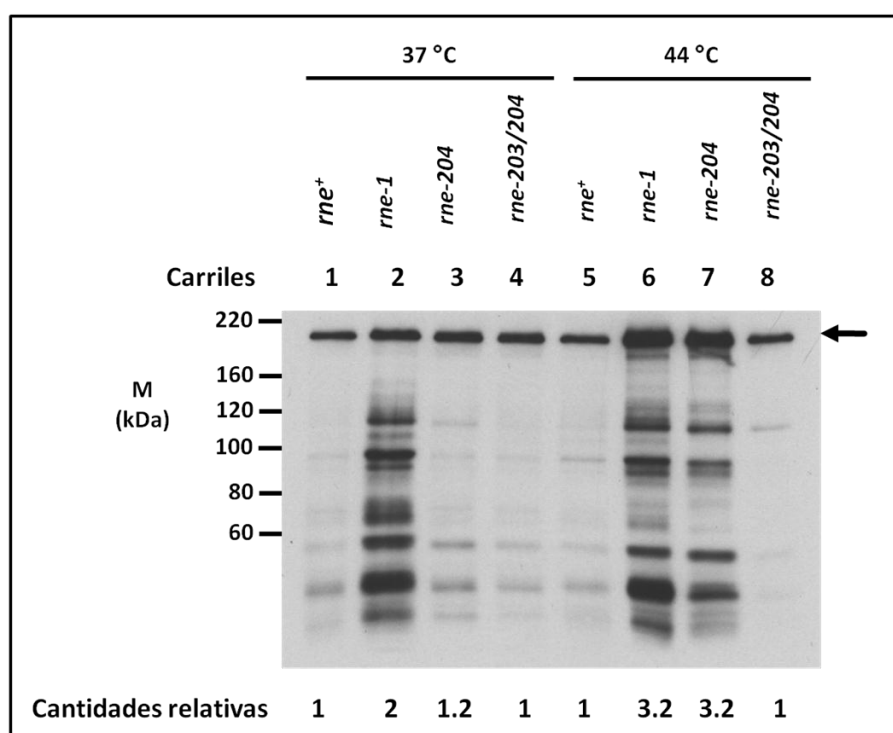


Figura 3.15 Análisis de los niveles intracelulares de la RNasa E en varias cepas mediante western blot. Los extractos de proteína total fueron aislados de cultivos crecidos exponencialmente a 37°C o cultivos crecidos primero a 30°C y luego transferidos a 44°C durante 2 horas. La RNasa E fue detectada con el anticuerpo RNasa E-MAP dirigido a los primeros 20 aminoácidos de la proteína y fue detectado usando el ELC plus system (GE Healthcare). Los western blot fueron escaneados y cuantificados usando un Storm 840 Phosphorimager. La flecha del margen derecho indica la versión de longitud completa de la RNasa E, mientras que las especies proteicas menores son producto de degradación de la proteína completa. La cantidad relativa de RNasa E en cada cepa y a cada temperatura es referida la cepa salvaje control *rne⁺*. Todos los alelos fueron portados en plásmidos de una copia en cepas que llevan el alelo *rneΔ1018::bla* en el cromosoma. El marcador de peso molecular de proteínas es indicado en la izquierda. Carriles 1 y 4, SK10143 (*rne⁺*); Carriles 2 y 5, SK10144 (*rne-1*); Carriles 3 y 6, SK3260 (*rne-204*); Carriles 4 y 8, SK3264 (*rne-204/203*).

A 44°C el alelo supresor intragénico de segundo sitio, *rne-204/203* restaura la autorregulación ya que los niveles de expresión de la RNasa E son similares a la cepa salvaje tanto a 37°C (Fig. 3.15 y 3.16; comparar carriles 1 y 4) como a 44°C (Fig. 3.15 y 3.16; comparar carriles 5 y 8). Por tanto, esta segunda mutación intragénica supresora ha revertido el carácter termosensible del mutante *rne-204* y ha restablecido la autorregulación. Otro resultado apreciable es que los niveles de proteína de los mutantes termosensible se incrementan solo 2 veces cuando se expresa bajo un plásmido de 6-8 copias al compararlo con plásmidos de copia sencilla (comparar los carriles 6 y 7 de la Fig. 3.15 con la Fig. 3.16). Esto indica que la autorregulación no está totalmente afectada como cabría esperar si solo dependiera de la actividad de la RNasa E.

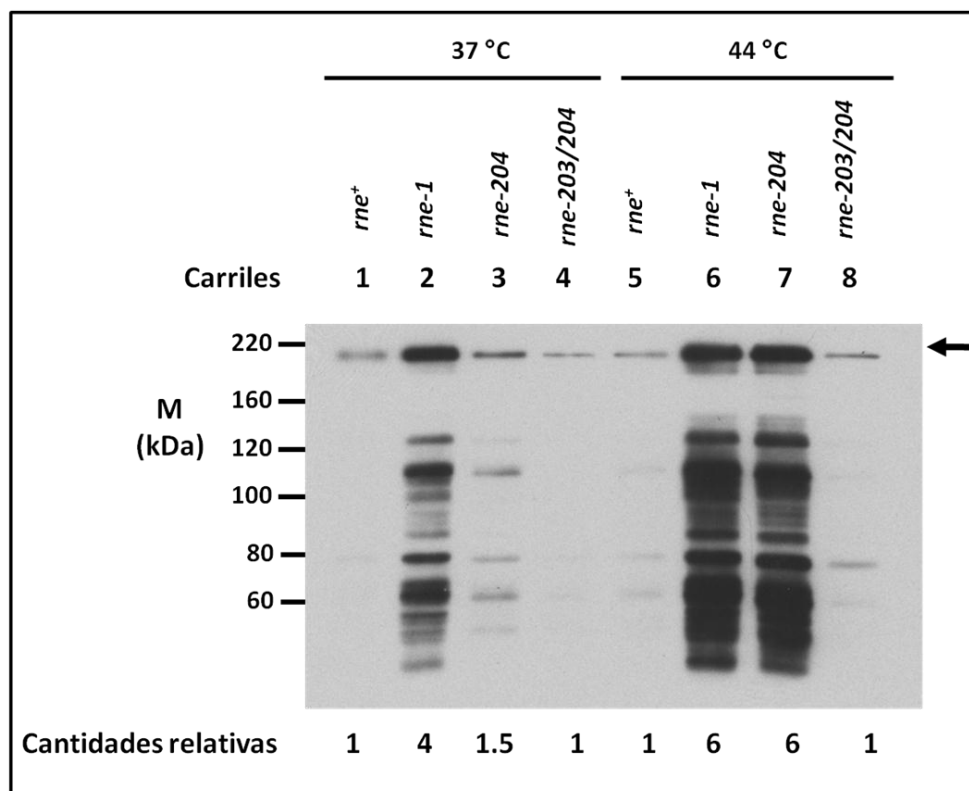


Figura 3.16 Análisis de los niveles intracelulares de la RNasa E en varias cepas mediante western blot. Los extractos de proteína total fueron aislados de cultivos crecidos exponencialmente a 37°C o cultivos crecidos primero a 30°C y luego transferidos a 44°C durante 2 horas. La RNasa E fue detectada con el anticuerpo RNasa E-MAP dirigido a los primeros 20 aminoácidos de la proteína y fue detectado usando el ELC plus system (GE Healthcare). Los western blot fueron escaneados y cuantificados usando un Storm 840 Phosphoroimager. La flecha del margen derecho indica la versión de longitud completa de la RNasa E, mientras que las especies proteicas menores son producto de degradación de la proteína completa. La cantidad relativa de RNasa E en cada cepa y a cada temperatura es referida la cepa salvaje control *rne⁺*. Todos los alelos fueron portados en plásmidos de 6-8 copias en cepas que llevan el alelo *rneΔ1018::bla* en el cromosoma. El marcador de peso molecular de proteínas es indicado en la izquierda. Carriles 1 y 4, SK9714 (*rne⁺*); Carriles 2 y 5, SK9937 (*rne-1*); Carriles 3 y 6, SK3251 (*rne-204*); Carriles 4 y 8, SK3269 (*rne-204/203*).

3.16 Análisis de la degradación de mRNA en los mutantes *rne-204* y *rne645/204*.

La RNasa E juega un papel central en la iniciación endorribonucleolítica de la mayoría de los mRNA celulares {Ow, 2000 #4} {Bernstein, 2004 #59} al que históricamente se le atribuido como la función esencial *in vivo* {Regnier, 2000 #725}. Como demostramos en el apartado anterior, la falta de autorregulación en los mutantes *rne-1*, *rne-204*, *rneΔ645* y *rneΔ645/204* a la temperatura de 44°C, sugiere que estas enzimas son probablemente defectivas en su capacidad de iniciar la endorribonucleolítica degradación de específicos mRNAs. Por el contrario, dado que el

doble mutante revertante *rne-204/203* es capaz de restaurar la autorregulación probablemente presente un perfil de degradación de mRNAs similar a la cepa control. Para comprobar estas hipótesis directamente nosotros determinamos la vida media de 6 transcritos diferentes (*trxA*, *cspE*, *lpp*, *ompA*, *rpsO* y *rpsT*), los cuales son RNasa E dependientes a 44°C en cepas llevando los alelos *rne-1*, *rne-204*, *rne-204/203*, *rneΔ645/204* y *rneΔ645*, en plásmidos de una copia o de 6-8 copias por célula. Los valores de vida media de todos los transcritos analizados a 44°C muestran una enorme similitud con los valores de la cepa control.

3.16.1 Degradación del mRNA *trxA*.

El gen *trxA*, codifica para la tiorredoxina y su mRNA monocistrónico de 493 nucleótidos se expresa de forma constitutiva. *In vitro* la tiorredoxina ha sido demostrado participar en la reducción de ribonucleotidos {Laurent, 1964 #730}, metionina sulfato {Gonzalez Porque, 1970 #731} {Tsang, 1976 #732} y reducción de puentes disulfuros {Holmgren, 1979 #734}. Además, la tiorredoxina funciona como subunidad esencial de la DNA polimerasa del bacteriófago T7 {Mark, 1976 #735} y tiene un esencial papel en el ensamblaje de los bacteriófagos filamentosos f1 y M13 {Russel, 1985 #736} {Russel, 1984 #737} {Lim, 1985 #738}. Experimentos *in vivo* previos han demostrado que incluso a la temperatura no permisiva existen tres especies del transcrito *trxA*. Se ha sugerido que este complejo patrón de bandas es consecuencia de la acción de múltiples rutas de degradación y algunas especies muestran una degradación más rápida que otras. La vida media del mRNA de *trxA* en la cepa control a 44°C, determinada por nosotros fue de 1.1 minutos, coincidiendo con valores previamente publicados {Ow, 2000 #4}. Cuando comparamos la vida media de la cepa control *rne*⁺ con los mutante truncados observamos un pequeño, pero reproducible incremento de la vida media de hasta 2 veces en el mutante *rneΔ645/204* y algo menor en el mutante *rneΔ645*. Como era de esperar en el mutante *rne-1*, se observó un ligero incremento de la vida media similar al encontrado en el mutante *rneΔ645*, pero ligeramente inferior al encontrado en *rne-204*. Por el contrario, la vida media del mRNA de *trxA* en el doble mutante revertante *rne-204/203* es similar a la cepa control.

Un dato curioso es que se observan múltiples intermediarios entre las especies de transcritos más largas.

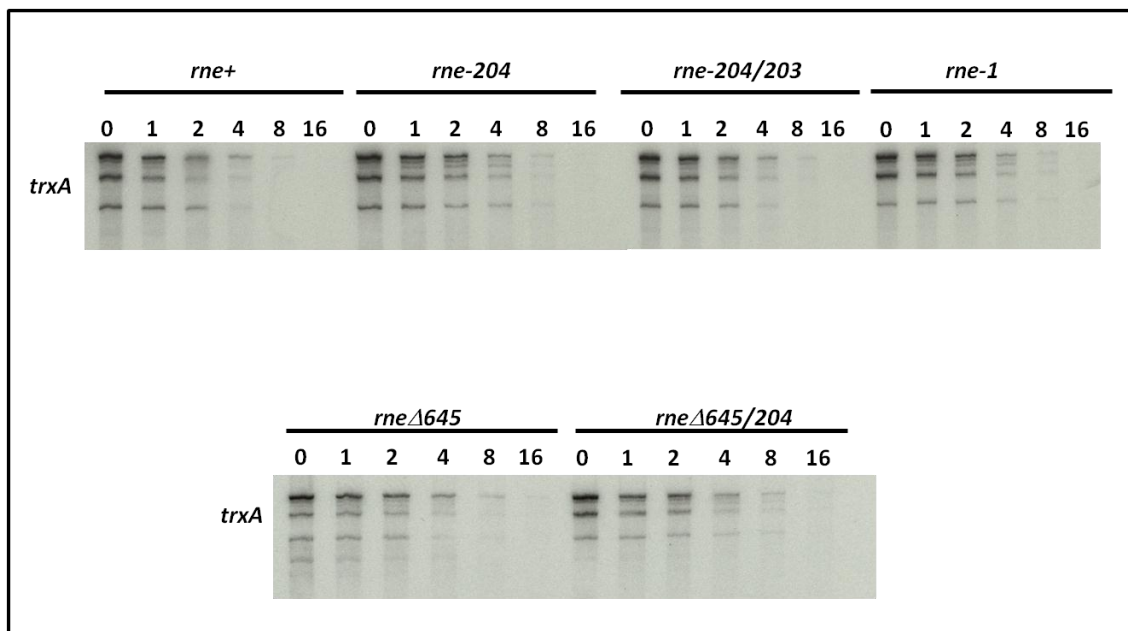


Figura 3.17 Perfil de degradación del mRNA de *trxA*. El análisis de la vida media del mRNA de *trxA* fue realizado mediante Northern Blot usando 5µg de RNA total de las cepas SK10143 (*rne*⁺), SK2685 (*rne*Δ645), SK2681 (*rne*Δ610), SK3271(*rne*Δ645/204), SK10144(*rne*-1), SK3260 (*rne*-204) y SK3264(*rne*-204/203). Los números encima de cada carril indican el tiempo, en minutos, después de transferir los cultivos en crecimiento exponencial a 44°C y de añadir la rifampicina para parar la iniciación de la transcripción.

3.16.2 Degradación de mRNA *cspE*.

Un descenso brusco de la temperatura de crecimiento, llamado golpe de frío, es uno de los diferentes estrés ambientales que puede experimentar *E. coli*. El gen *cspE*, es fuertemente inducido por un golpe de frío y su capacidad inductora está relacionada con la región 5'-UTR, la cual muestra estructuras secundarias alternativas a 37°C y 15°C. Ha sido sugerido que la RNasa E regula la estabilidad del transcrito posiblemente a través del ensamblaje del degradosoma {Uppal, 2008 #729}. La vida media del mRNA de *cspE* de la cepa control *rne*⁺ a 44°C fue de aproximadamente 3.3 minutos similar al mutante revertante *rne*-204/203 mientras que en los mutantes *rne*Δ645 y *rne*Δ645/204 la vida media aumentó 3 y 5 veces, respectivamente. Estos resultados parecen indicar que este transcrito es dependiente del degradosoma para

su correcta degradación, tal y como proponen Uppal y colaboradores {Uppal, 2008 #729}. Como era de esperar el mutante *rne-1* presenta una vida media superior de 3.6 veces a la cepa salvaje, pero al igual que en el caso anterior, el transcrito *trxA*, este incremento es inferior al alcanzado por el mutante *rne-204* (4.5 veces).

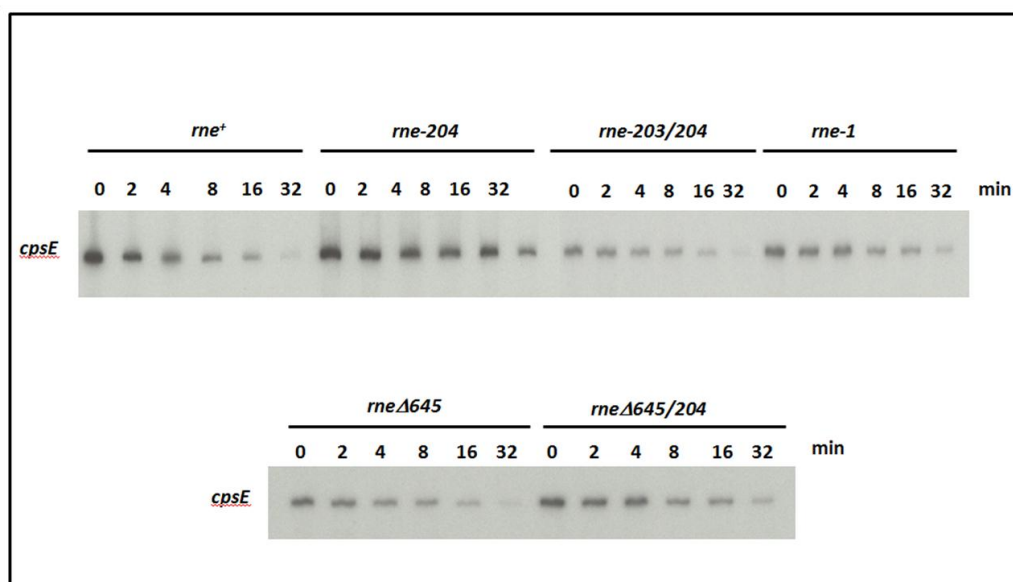


Figura 3.18 Perfil de degradación del mRNA de *cspE*. El análisis de la vida media del mRNA de *cspE* fue realizado mediante Northern Blot usando 5µg de RNA total de las cepas SK10143 (*rne*⁺), SK2685 (*rne*Δ645), SK2681 (*rne*Δ610), SK3271(*rne*Δ645/204), SK10144(*rne*-1), SK3260 (*rne*-204) y SK3264(*rne*-204/203). Los números encima de cada carril indican el tiempo, en minutos, después de transferir los cultivos en crecimiento exponencial a 44°C y de añadir la rifampicina para parar la iniciación de la transcripción.

3.16.3 Degradación de mRNA *Lpp*

Lpp es la principal lipoproteína de la membrana externa {Inouye, 1972 #739}, la cual mantiene la integridad de la superficie celular mediante la conexión de la membrana externa a la mureína {Suzuki, 1978 #740}. El mRNA de *lpp* posee una alta estabilidad con un valor de vida media en la cepa control SK10143 (*rne*⁺) de casi 12 minutos. El mutante *rne*Δ645/204 muestra un incremento de 2 veces mientras que en el mutante *rne*Δ645 se incrementa 1.4. Al igual que en los caso anteriores el doble mutante revertante no muestra diferencias significativas con la cepa control. En los mutantes *rne*-1 y *rne*-204 la estabilidad muestra un incremento de 2 veces con respecto a la cepa control SK10143 (*rne*⁺) (ver tabla 3.4).

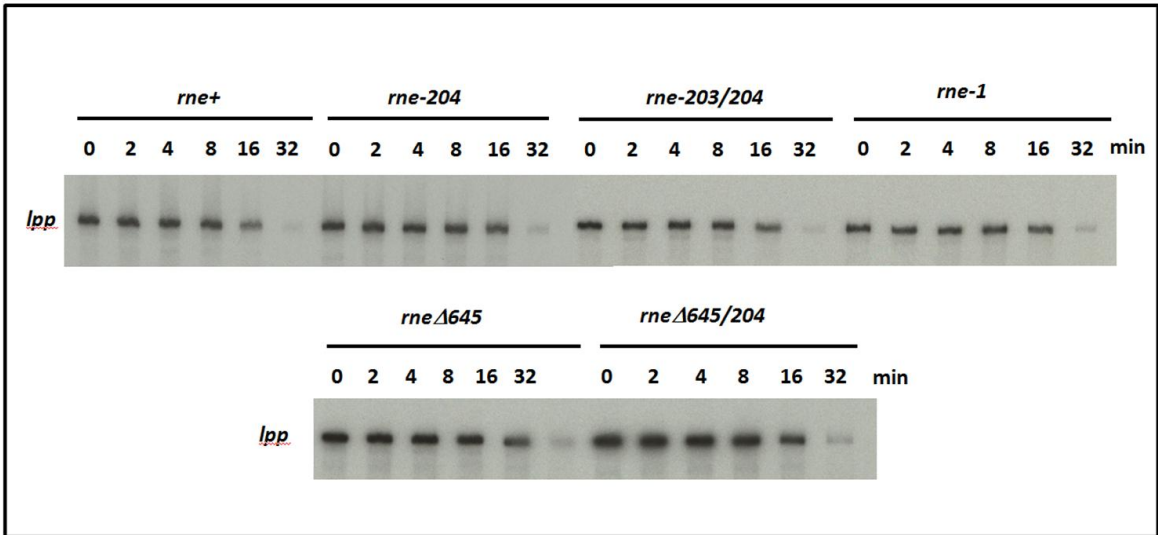


Figura 3.19 Perfil de degradación del mRNA de *lpp* .El análisis de la vida media del mRNA de *lpp* fue realizado mediante Northern Blot usando 5μg de RNA total de las cepas SK10143 (*rne*⁺), SK2685 (*rneΔ645*), SK2681 (*rneΔ610*), SK3271(*rneΔ645/204*), SK10144(*rne-1*), SK3260 (*rne-204*) y SK3264(*rne-204/203*). Los números encima de cada carril indican el tiempo, en minutos, después de transferir los cultivos en crecimiento exponencial a 44°C y de añadir la rifampicina para parar la iniciación de la transcripción.

3.16.4 Degradación de mRNA *rpsO*

El mRNA de *rpsO* es monocistrónico codifica para la proteína ribosomal S15. La degradación *in vivo* del mRNA de *rpsO* es la mejor caracterizada de todos los procesos de degradación de mRNA en *E. coli* {Hajnsdorf, 1996 #726}. El gen *rpsO* puede dar lugar principalmente a dos especies de mRNA que resultan de la terminación natural del transcrito primario en el sitio t1 o del procesamiento del transcrito primario por la RNasa III {Portier, 1987 #682} {Hajnsdorf, 1994 #728}.En concordancia con resultados previamente publicadas {Ow, 2000 #4} {Ow, 2003 #27}, nosotros encontramos un incremento significativo de la vida media del principal transcrito, *rpsO*_{P1-t1} {Hajnsdorf, 1994 #728} desde 3 minutos en la cepa control hasta 12 en el mutante *rne-1* (Fig. 3.20 y tabla 3.4) y 17 minutos en el *rne-204*. En contraste las vidas medias del transcrito *rpsO*_{P1-RIII} no son tan elevadas como en el transcrito anterior y las diferencias con respecto a la cepa control son mucho menores. Sorprendentemente, y a diferencia de *rne-204* y *rne-1*, el transcrito, *rpsO*_{P1-t1} aumenta su vida media en el los mutantes truncados de la RNasa E hasta 9 veces para el *rneΔ645* y 10 veces para el *rneΔ645/204*. Se ha descrito que cualquier transcrito que escapa de la terminación t1, pero es

procesado por el sitio distal de la RNasa III será probablemente recortado un proceso por exonucleolítico por la RNasa II o posiblemente por la PNPasa. Por tanto, el incremento de la vida media por la falta del degradosoma en los mutantes truncados indica que probablemente la degradación del transcrito *rpsO*_{P1-RIII} es principalmente mediada por la PNPasa asociada al degradosoma.

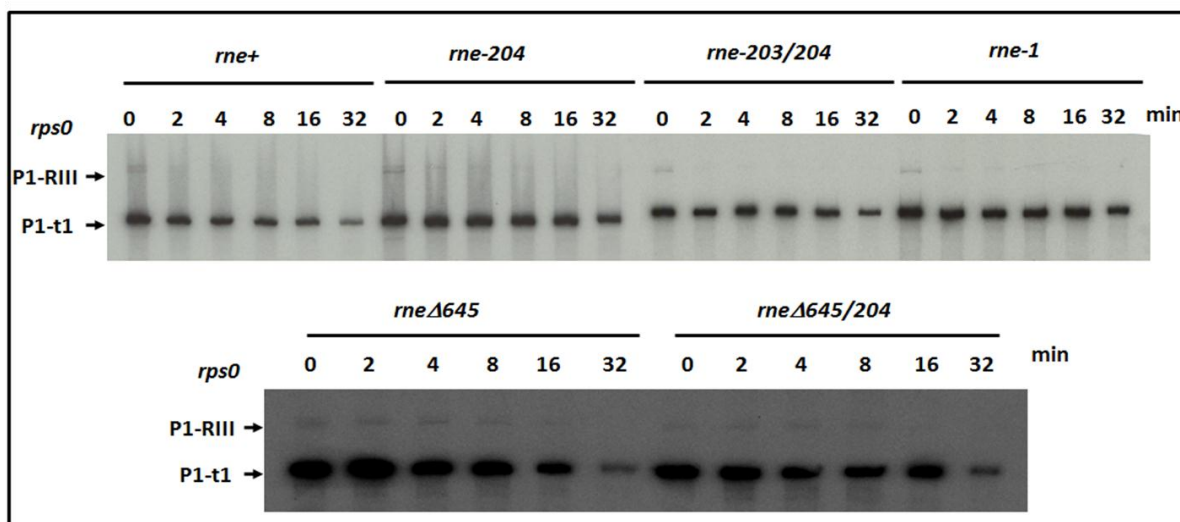


Figura 3.20 Perfil de degradación del mRNA de *rpsO*. El análisis de la vida media del mRNA de *rpsO* fue realizado mediante Northern Blot usando 5µg de RNA total de las cepas SK10143 (*rne*⁺), SK2685 (*rne*Δ645), SK2681 (*rne*Δ610), SK3271 (*rne*Δ645/204), SK10144 (*rne*-1), SK3260 (*rne*-204) y SK3264 (*rne*-204/203). Los números encima de cada carril indican el tiempo, en minutos, después de transferir los cultivos en crecimiento exponencial a 44°C y de añadir la rifampicina para parar la iniciación de la transcripción.

3.16.5 Degradación de mRNA *ompA*.

El transcrito *ompA* de 1215 b, el cual codifica para la proteína de la membrana externa A tiene un importante papel estructural, está implicada en la estabilidad de la membrana externa y es requerida para la absorción de muchos fagos y para el comienzo de la conjugación. Su estabilidad es alta con respecto a los anteriores transcritos y depende de las regiones 5' y 3' UTR del transcrito. La cepa control muestra una vida media a 44°C de 6.5 minutos idéntica a la mostrada por el mutante *rne*-204/203. El mutante *rne*-1 incrementa su vida media hasta 3 veces al igual que

rneΔ645, mientras que *rne-204* y *rneΔ645/204* muestran un ligero incremento, pero reproducible.

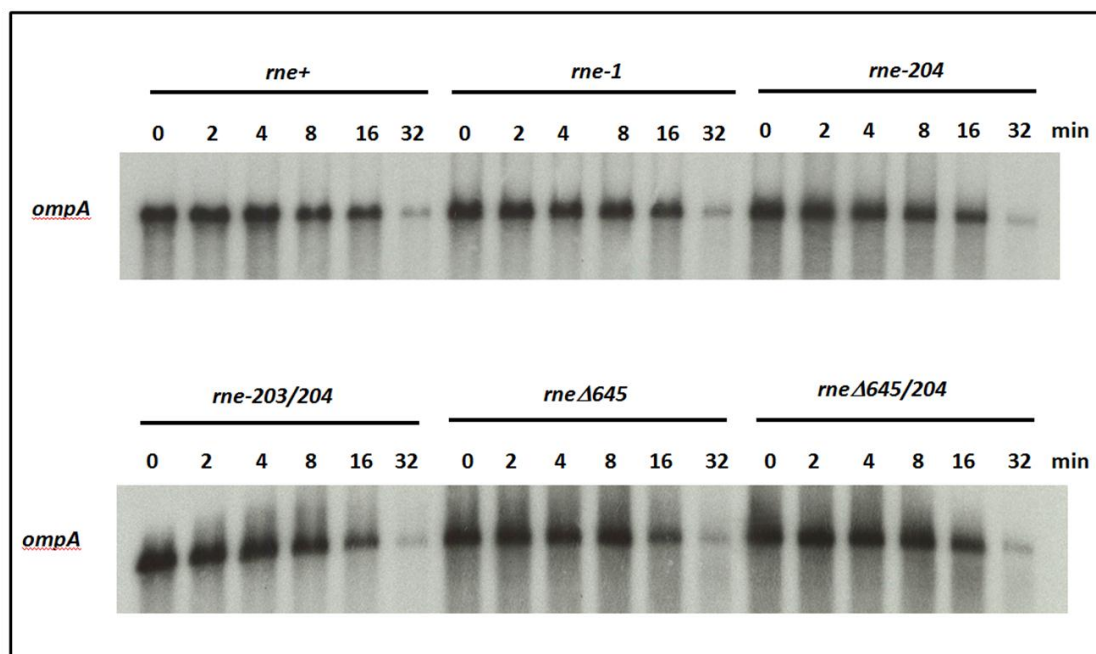


Figura 3.21 Perfil de degradación del mRNA de *ompA*. El análisis de la vida media del mRNA de *ompA* fue realizado mediante Northern Blot usando 5μg de RNA total de las cepas SK10143 (*rne*⁺), SK2685 (*rneΔ645*), SK2681 (*rneΔ610*), SK3271 (*rneΔ645/204*), SK10144(*rne-1*), SK3260 (*rne-204*) y SK3264(*rne-204/203*). Los números encima de cada carril indican el tiempo, en minutos, después de transferir los cultivos en crecimiento exponencial a 44°C y de añadir la rifampicina para parar la iniciación de la transcripción.

3.16.6 Degradación de mRNA *rpsT*.

Al igual que el mRNA de *rspO*, el mRNA *rpsT* monocistrónico codifica para la proteína ribosomal S20. Existen dos *rpsT* mRNAs, *rpsT_{P1}* de 447 y *rpsT_{P2}* de 356 ribonucleótidos, los cuales son transcritos desde dos promotores en tandem separados por 91 bp, pero comparten el mismo terminador Rho independiente. Los transcritos *rpsT_{P1}* y *rpsT_{P2}* presentan un incremento desigual de la estabilidad en los mutantes termosensibles. De modo que el *rpsT_{P1}* aumenta su vida media entre 2 y 3 minutos más que el transcrito *rpsT_{P2}*. Curiosamente en los mutantes truncados también se ve afectada la vida media debido a la ausencia de la región C-terminal. El transcrito *rpsT_{P1}* presenta un aumento de la estabilidad en los mutantes es menos dramática cuando

se inactiva la RNasa E, ya que las diferencias no son tan grandes, pero se mantienen las diferencias.

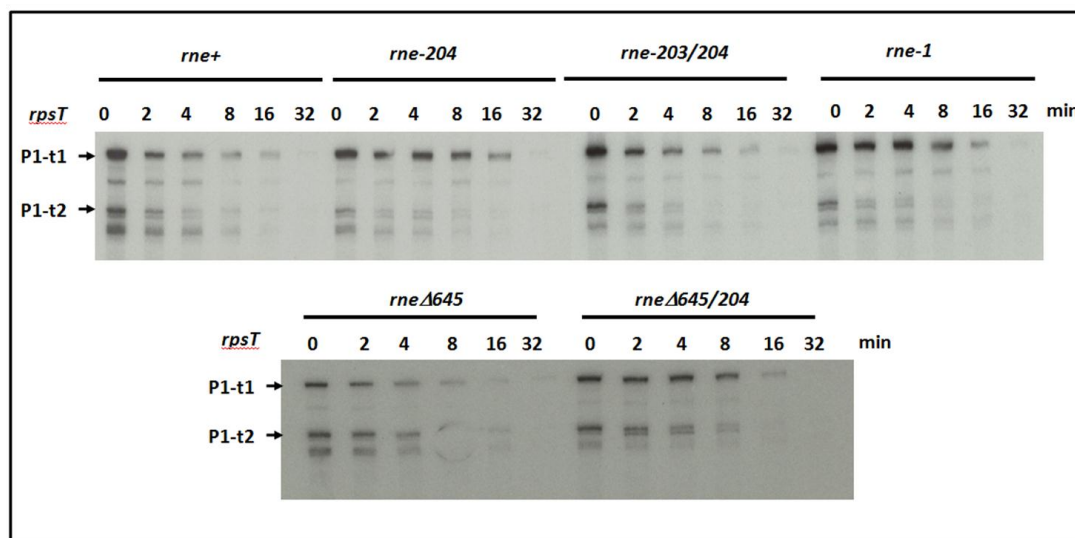


Figura 3.22 Perfil de degradación del mRNA de *rpsT*. El análisis de la vida media del mRNA de *rpsT* fue realizado mediante Northern Blot usando 5µg de RNA total de las cepas SK10143 (*rne*⁺), SK2685 (*rne*Δ645), SK2681 (*rne*Δ610), SK3271 (*rne*Δ645/204), SK10144(*rne*-1), SK3260 (*rne*-204) y SK3264(*rne*-204/203). Los números encima de cada carril indican el tiempo, en minutos, después de transferir los cultivos en crecimiento exponencial a 44°C y de añadir la rifampicina para parar la iniciación de la transcripción.

Tabla 3.4. Vidas de los mRNA analizados en los diferentes mutantes.

Transcrito	<i>rne</i> ⁺	<i>rne</i> -1	<i>rne</i> -204	<i>rne</i> -204/203	<i>rne</i> Δ645	<i>rne</i> Δ645/204
<i>trxA</i>	1.1±0.0	1.5±0.3	1.7±0.2	1.2±0.1	1.6±0.0	2.1±0.1
<i>cpsE</i>	3.3±0.3	12±0.4	15.05±0.6	3.2±0.3	9.70±0.4	16.72±0.8
<i>lpp</i>	11.6±0.3	20.0±0.5	21±0.9	12.05±0.5	17±1.2	23.5±0.3
<i>rpsO</i> P1-RIII	1.4±0.5	2.4±0.5	2.6±0.5	1.7±0.5	9.03±0.3	10.4±0.4
<i>rpsO</i> P1-t1	3.0±0.5	12.0±0.5	17.3±1.0	3.5±0.6	12.4±0.6	13.6±0.9
<i>rpsT</i> P1-t1	2.4±0.5	8.2±0.6	10.0±0.8	2.8±0.4	4.1±0.4	13±0.9
<i>rpsT</i> P1-t2	2.6±0.8	6.2±0.3	7.0±0.4	2.5±0.9	3.5±0.5	7.9±1.0
<i>ompA</i>	8.5±2.1	20.0±2	21.1±3	9.0±0.9	20.1±0.6	21.5±3

3.17 Implicación de la RNasa E en la morfología y división celular.

La inactivación o delección del gen *rne* produce una morfología celular filamentosa en cultivos de *E. coli* en medio líquido y una pérdida de la capacidad de formar colonias en medio sólido {Goldblum, 1981 #568} {Wang, 1994 #81}{Tamura, 2006 #55}. La disfunción de la RNasa E también está asociada con un anormal procesamiento del transcrito policistrónico *ftsQAZ*, el cual codifica para proteínas implicadas en la separación física de la célula en el lugar de la división {Cam, 1996 #482}. Además, ha sido observado que la inactividad de la RNasa E resulta en una disminución de la expresión de la proteína FtsZ y un aumento de la proteína FtsA, y consecuentemente, en una alteración del ratio FtsZ/FtsA, lo cual produce un fenotipo filamentoso {Tamura, 2006 #55}. Takada y colaboradores {Takada, 2005 #268} observaron que mediante la expresión artificial de la proteína FtsZ desde un plásmido suprimían parcialmente la sensibilidad a la temperatura de un mutante termosensible de la RNasa E y consecuentemente concluyeron que una reducción del nivel de FtsZ es responsable de la no viabilidad de los mutantes de la RNase E en *E. coli* {Takada, 2005 #268}. Por el contrario, un año más tarde se observó en cepas de *E. coli* carentes de actividad RNasa E que una disminución de los niveles de FtsZ resulta en un fenotipo filamentoso, pero no es responsable de la esencialidad de la RNasa E {Tamura, 2006 #55}. Todas estas consideraciones demuestran la implicación de la RNasa E en la morfología y división celular.

3.18 Los mutantes *rne-204* y *rneΔ645/204* presentan una disminución de los niveles de expresión de las proteínas FtsA y FtsZ.

En análisis previos se había observado una relación entre la inactividad de la RNasa E y la alteración de los niveles de expresión de las proteínas FtsZ y FtsA {Tamura, 2006 #55} {Takada, 2005 #268}. Nosotros comparamos los niveles de expresión de las proteínas de FtsZ y FtsA entre los diferentes mutantes termosensibles de la RNasa E crecidos en medio líquido a 37°C y 44°C. Las diferentes cepas fueron previamente crecidas a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial. Posteriormente los cultivos fueron

transferidos a 37°C o 44°C durante 2 horas. Durante este período los cultivos fueron diluidos varias veces para mantenerlos en fase exponencial. Se obtuvieron extractos de proteínas de las diferentes cepas para realizar el western blotting usando anticuerpos anti-FtsZ y anti-FtsA, tal y como se describe en materiales y métodos. Cuando examinamos el nivel de expresión de la proteína FtsZ a 44°C en el mutante *rneΔ645/204* (Fig. 3.23; carril 8 de FtsZ) se aprecia una disminución muy significativa de hasta 8 veces con respecto al nivel de la misma cepa a 37°C (Fig. 3.23; comparar los carriles 4 y 8 de FtsZ) y de 15 veces con respecto a la cepa salvaje a 44 °C (Fig. 3.23; comparar los carriles 5 y 8 de FtsZ). En contraste, el mutante termosensible de la versión truncada de la RNasa E, *rneΔ610*, muestra una ligera diferencia entre sus niveles de FtsZ a 37°C y 44°C (Fig. 3.23; comparar los carriles 3 y 7 de FtsZ), pero su nivel de FtsZ a 44°C es, aproximadamente, 2 veces inferior con respecto al nivel de la cepa salvaje *rne⁺*, a 44 °C (Fig. 3.23; comparar los carriles 5 y 7 de FtsZ). Curiosamente, y al contrario de lo que ocurre en los mutantes *rneΔ645/204* y *rneΔ610*, tanto la cepa salvaje como la cepa que expresa la versión truncada y funcional a 44°C *RneΔ645*, presentan un incremento de sus niveles de FtsZ a 44°C con respecto a 37°C (Fig. 3.23; comparar los carriles 1 y 2 con los carriles 5 y 6 de FtsZ), aunque la expresión total de FtsZ en la cepa salvaje es algo superior a la del mutante *rneΔ645* a 44°C (Fig. 3.23; comparar los carriles 5 y 6 de FtsZ).

Al igual que ocurre con FtsZ, el nivel de expresión de la proteína FtsA del mutante termosensible *rneΔ645/204* disminuyó hasta 3.6 veces a la temperatura de 44°C con respecto a la cepa salvaje *rne⁺* a la mismas temperatura (Fig. 3.23; comparar los carriles 5 y 8 de FtsA) y 1.6 veces con respecto a su nivel de expresión a 37°C (Fig. 3.23; comparar los carriles 4 y 8 de FtsA). En cambio para mutante *rneΔ610*, no se observan diferencias entre la expresión de FtsA a 37°C y 44°C (Fig 3.23; comparar los carriles 3 y 7 de FtsA), pero si un descenso de 2.25 veces con respecto a la cepa salvaje a 44°C (Fig. 3.23; comparar los carriles 5 y 7 de FtsA). Por el contrario, y al igual que ocurría con la expresión de FtsZ, tanto la cepa salvaje como el mutante truncado *rneΔ645* funcional mostraron un aumento del nivel de FtsA a 44°C de 1.8 y 1.6 veces, respectivamente, con respecto a sus niveles a 37°C (Fig. 3.23; comparar los carriles 1 y

2 con los carriles 5 y 6 de FtsA), aunque, al igual que en el caso de FtsZ, la expresión total de FtsA de la cepa salvaje fue superior al del mutante *rneΔ645* a 44°C (Fig 3.23; comparar los carriles 5 y 6 de FtsA).

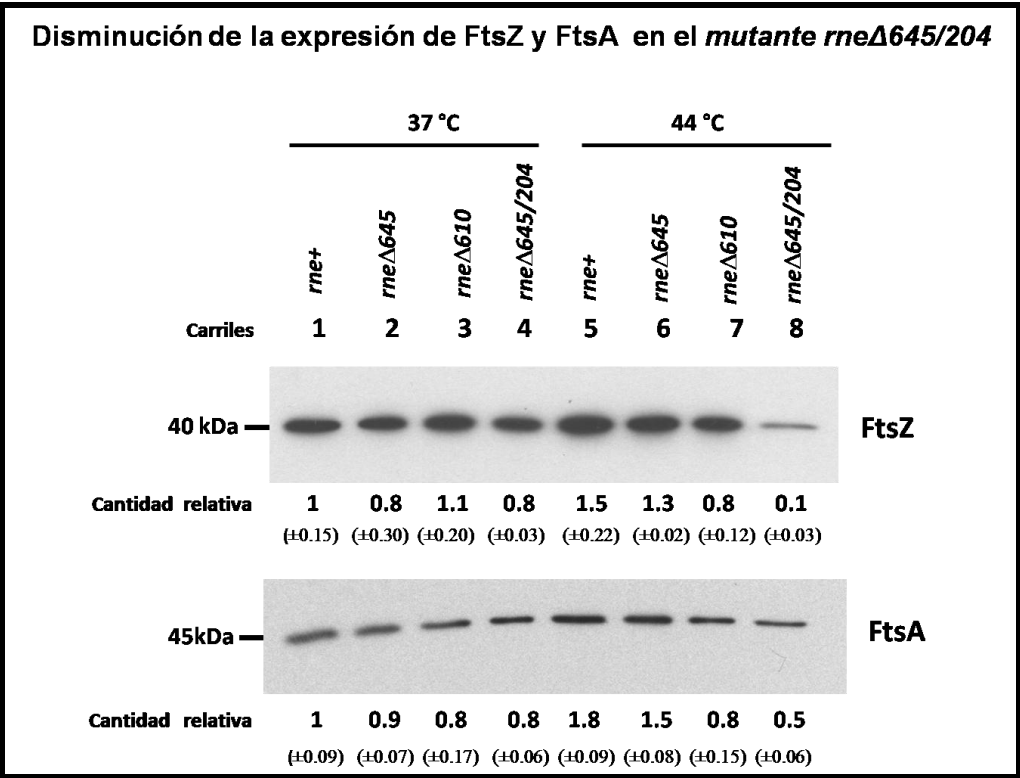


Figura 3.23 Comparación de los niveles de las proteínas de FtsZ y FtsA entre diferentes mutantes truncados de la RNasa E crecidos a 37°C y 44°C durante 2 horas. Las diferentes cepas fueron previamente crecidas a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial. Posteriormente los cultivos fueron transferidos a 37°C o 44 °C durante 2 horas, durante este período los cultivos fueron diluidos varias veces para mantenerlos en fase exponencial. Extractos de proteína total fueron obtenidos para realizar western blotting usando los anticuerpos anti-FtsZ y anti-FtsA, tal y como se describe en materiales y métodos. Los niveles de expresión FtsZ y FtsA fueron estimados usando el Phosphoroimager. Las cantidades de FtsZ y FtsA relativas a la cantidad de la cepa salvaje a 37°C y sus desviaciones típicas (en paréntesis) mostradas debajo de los carriles, fueron calculadas a partir de tres experimentos independientes. Los niveles de FtsZ y FtsA fueron normalizados a la cantidad de proteína total teñida con Sypro Orange antes de la transferencia.

En el caso del mutante *rne-204*, se puede ver un descenso de 2 veces los niveles de FtsZ a 44°C al compararlo con su nivel a 37°C (Fig. 3.24; comparar los carriles 3 y 7 de FtsZ), en cambio, para el mutante *rne-1* se observa una diferencia menor

entre los niveles de proteína FtsZ a 37°C y 44°C (Fig. 3.24; carriles 2 y 6 de FtsZ). Cuando comparamos los niveles de FtsZ a 44°C de *rne-204* y *rne-1* con el nivel de la cepa salvaje a la misma temperatura (Fig. 3.24; comparar el carril 5 con los carriles 6 y 7) observamos una disminución de 3 y 2 veces, respectivamente, de la cantidad de proteína FtsZ. Por otro lado, y como era de esperar, niveles de expresión de FtsZ del doble mutante revertante, *rne-204/203* fueron similares a los de la cepa salvaje tanto a 37°C como a 44°C (Fig. 3.24; comparar los carriles 1 y 4 con los carriles 5 y 8). Además, y al igual que ocurre en la cepa salvaje, el doble mutante revertante, *rne-204/203* mostró un incremento en los niveles de FtsZ cuando fue crecida a 44°C comparado con su nivel a 37°C (Fig. 3.24; comparar los carriles 4 y 8 de FtsZ). En cuanto a la expresión de FtsA, se observó en la cepa *rne-204* muestra una ligera disminución a 44°C (1,42 veces) con respecto a 37°C (Fig. 3.24; comparar los carriles 3 y 7 de FtsA) mientras el mutante *rne-1* no mostraba diferencias entre ambas temperaturas (Fig. 2; carriles 2 y 6 de FtsA). Sin embargo, se aprecian niveles de FtsA inferiores en los mutantes *rne-204* y *rne-1* a 44°C con respecto a la cepa salvaje de 2,14 y 1,87 veces, respectivamente (Fig. 3.24; comparar el carril 5 con los carriles 6 y 7 de FtsA). En cambio, y como era de esperar, el doble mutante revertante mostraba niveles idénticos de FtsA a 37°C y 44°C con respecto a la cepa salvaje (Fig. 3.24; carriles 1, 4, 5 y 7 de FtsA). En la cepa salvaje el incremento del nivel de FtsA a 44°C con respecto a su nivel a 37°C es ligeramente mayor que el incremento del nivel de FtsZ (Fig. 3.24; comparar los carriles 1 y 5 de FtsZ con los carriles 1 y 5 de FtsA).

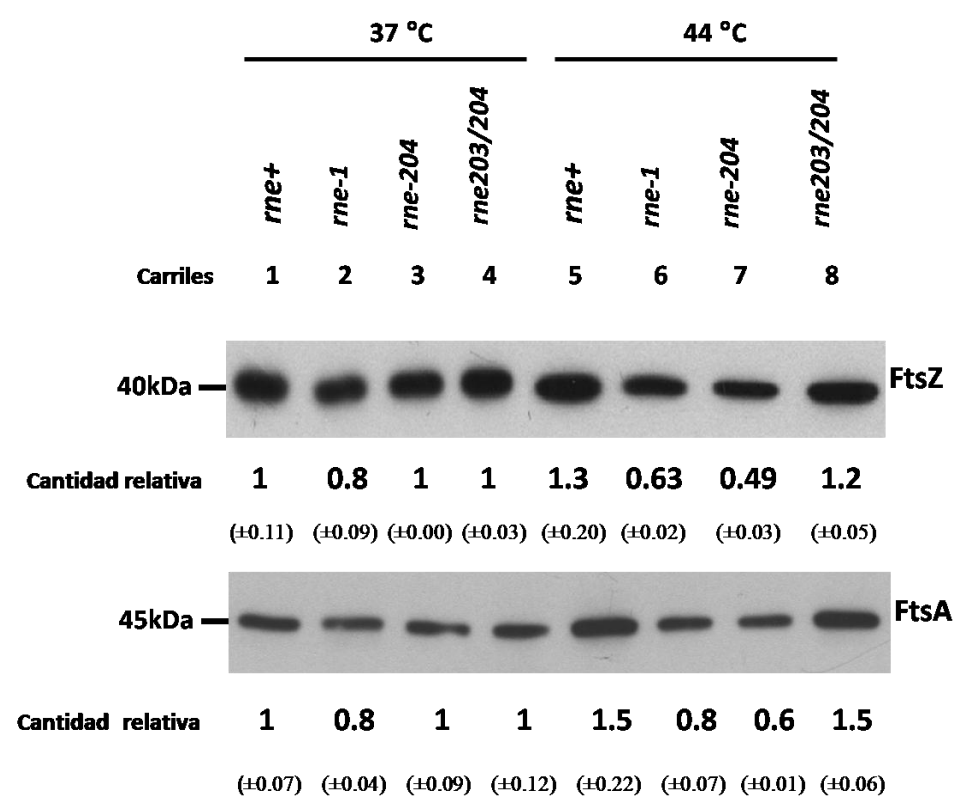


Figura 3.24 Comparación de los niveles de las proteínas de FtsZ y FtsA entre diferentes mutantes puntuales de la RNasa E crecidos a 37°C y 44°C durante 2 horas. Las diferentes cepas fueron previamente crecidas a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial. Posteriormente los cultivos fueron transferidos a 37°C o 44 °C durante 2 horas, durante este período los cultivos fueron diluidos varias veces para mantenerlos en fase exponencial. Extractos de proteína total fueron extraídos para realizar western blotting usando los anticuerpos anti-FtsZ y anti-FtsA, tal y como se describe en materiales y métodos. Los niveles de expresión FtsZ y FtsA fueron estimadas usando el Phosphorimager. Las cantidades de FtsZ y FtsA relativas a la cantidad de la cepa salvaje a 37°C y sus desviaciones típicas (en paréntesis) mostradas debajo de los carriles, fueron calculadas de tres experimentos independientes. Los niveles de FtsZ y FtsA fueron normalizados a la cantidad de proteína total teñida con Sypro Orange antes de la transferencia.

3.19 La estabilidad de los transcritos policistrónicos *ftsQAZ* y *ftsAZ* aumentan en el mutante *rne-204*.

Cam y colaboradores {Cam, 1996 #482}, mediante experimentos de protección a nucleasa S1, demostraron que el transcrito policistrónico *ftsA-ftsZ* es cortado por la RNasa E afectando así la degradación de los mRNA de *ftsA* y *ftsZ*. Se sabe que no existen regiones de fin de transcripción entre *ftsA* y *ftsZ*. Además, y como consecuencia de ese corte, ellos también sugirieron, que la RNasa E también contribuye a la expresión diferencial de los dos genes.

Mediante análisis de Northern blot nosotros estudiamos el tamaño de los transcritos *ftsZ* y la vida media de los mismos. RNA total desnaturalizado con glioxal fue fraccionado por electroforesis en agarosa sin tampón de recirculación y transferido a una membrana de nylon. Una sonda de DNA de 900 bp del gen *ftsZ* marcada radiactivamente fue usada para detectar los transcritos *ftsZ*. Los resultados (Fig. 3.25), mostraron la detección *in vivo* de dos transcritos policistrónicos *ftsQAZ* (incluye *ftsQ*, *ftsA* y *ftsZ*) y *ftsAZ* (incluye parte del gen *ftsA* y *ftsZ*) de un tamaño de aproximadamente 2.3 y 1.8 kb, respectivamente, los cuales son transcritos a partir de los promotores *ftsQ2p* y *1p* (localizados dentro del gen *ddl*) y del promotor *ftsZ4p* (localizado dentro del gen *ftsA*), respectivamente (Fig. 3.25). Estos promotores son los más importantes de los seis promotores implicados en la transcripción de *ftsZ* y contribuyen con el 83% de la transcripción total de *ftsZ*.

Se analizó el efecto de la mutación *rne-204* en la estabilidad de los transcritos policistrónico, los cuales contienen *ftsZ*, mediante análisis de Northern blot de RNA total extraído de la cepa salvaje y los mutantes termosensibles *rne-204* y *rne-1* a 44°C, en estado estable y a distintos tiempos (0, 2, 4, 8, 16 y 32 minutos) después de inhibir la transcripción con rinfampimicina. Nuestros resultados fueron consistentes con el efecto de la inactivación de la RNasa E sobre la modificación de la estabilidad de los transcritos de *ftsQAZ* descrito por Cam y colaboradores {Cam, 1996 #482}. La vida media de los transcritos policistrónico *ftsQAZ* y *ftsAZ* fue de 4.6 minutos a 44°C en la cepa salvaje. A esa misma temperatura, la inactivación de la RNasa E en los mutantes termosensibles resultó en una vida media de 10 minutos en el mutante *rne-204* y 7 minutos en el mutante *rne-1* (Fig. 3.25). Esto demuestra la implicación directa de la RNasa E en la degradación y/o procesamiento de los transcritos *ftsQAZ* y *ftsAZ*.

A pesar del incremento de la estabilidad de ambos transcritos policistrónicos en el mutante termosensible *rne-204* de 2.26 veces y en el mutante *rne-1* de 1.75 veces comparado con la cepa salvaje a 44 °C (Fig. 3.25), los niveles de proteínas FtsA y FtsZ fueron inferiores a la cepa salvaje a 44°C (Fig. 3.24). Por tanto, no existe una relación directa entre la estabilidad de los mRNA de *ftsZ* y *ftsA* con sus niveles de expresión. Esta diferencia puede estar relacionada en la implicación de la RNasa E en la correcta

maduración de los transcritos policistrónicos *ftsQAZ* y *ftsAZ* necesaria para una eficiente traducción de FtsA y FtsZ, coincidiendo con las observaciones de Cam *et al.* en relación a la expresión diferencial de *ftsZ* y *ftsA*.

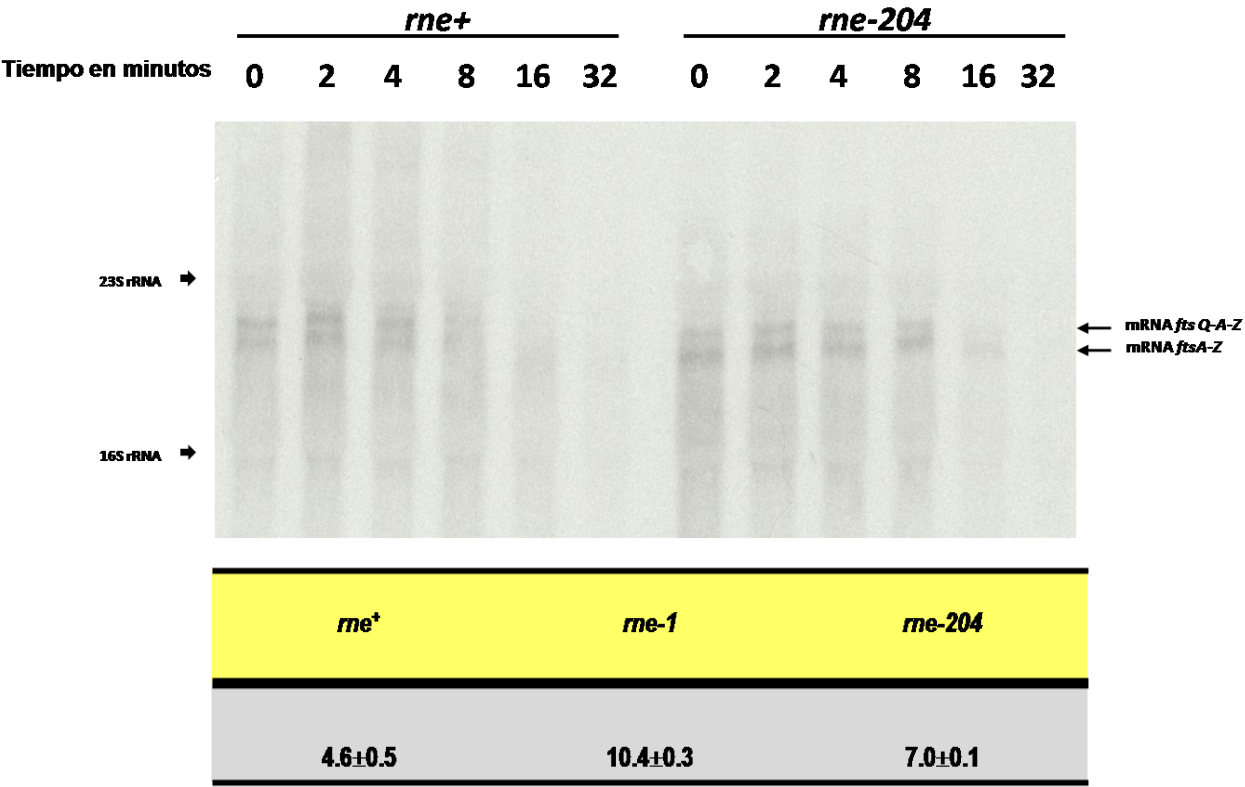


Figura 3.25. Efecto de la mutación *rne-204* en la degradación del *ftsZ* mRNA. RNA total celular fue extraído de las células crecidas a 44 °C durante 2 horas. A) El mRNA de *ftsZ* fue analizado mediante Northern blotting como se describe en materiales y métodos. Las posiciones del 16S y 23S rRNA son indicadas en el margen izquierdo. B) Se muestran los valores medios de vida media de los principales transcritos de *ftsZ* a 44°C. Los datos representan la media de dos experimentos independientes.

3.20 Los mutantes *rne-204* y *rneΔ645/204* presentan una morfología celular filamentosa.

Trabajos previos han demostrado una morfología filamentosa de *E. coli* durante el crecimiento en medio líquido debido a la inactivación de la RNasa E {Goldblum, 1981 #568} {Wang, 1994 #81}. Por otra parte, la exposición a altas temperaturas de un mutante termosensible del gen *ftsZ* de *E. coli* presenta un completo e inmediato bloqueo de la división celular y formación de células filamentosas carentes de puntos

visibles de constricción y anillos contráctiles {Bramhill, 1997 #713} {Dewar, 2000 #714}. Además, se ha sugerido que la proteína FtsZ es el factor limitante para la iniciación del septo de división celular. Ante todos estos antecedentes, nosotros decidimos analizar el fenotipo de la morfología celular de los mutantes *rneΔ645/204* y *rne-204* comparándola con la cepa salvaje y el mutante termosensible *rne-1* mediante microscopia contraste de fase. Además, usando un microscopio de epifluorescencia observamos el número de nucleoides en estas células filamentosas de *E. coli* al teñirlas con DAPI después de haber sido incubadas a 37°C (Fig. 3.26) y 44°C con vigorosa agitación durante dos horas.

A diferencia de la cepa salvaje, aproximadamente un 20 % de la población del mutante *rne-1* mostraba una morfología celular de filamentos cortos (Fig. 3.26) conteniendo un número de nucleoides comprendido entre 5-10 a 37°C. La mayor parte de la población del mutante *rneΔ645/204* mostraba una morfología de filamentos cortos similar a la del mutante *rne-1*, pero alrededor de un 15% de la población presentaba un aspecto de filamentos largos conteniendo un número de nucleoides comprendido entre 10-17 (Fig. 3.26). En el caso del mutante *rne-204*, este mostraba una morfología más elongada que la cepa salvaje, pero menor que el mutante *rne-1*. Este resultado fue inesperado porque a 37°C el mutante *rne-204* mostraba una tasa de crecimiento y unos niveles de FtsZ y FtsA (Fig. 3.25) similares a la cepa salvaje, con lo cual no esperamos ver ninguna diferencia fenotípica. La población de células presentaba un aspecto de filamentos cortos en los que se podía apreciar un máximo de 5 nucleoides.

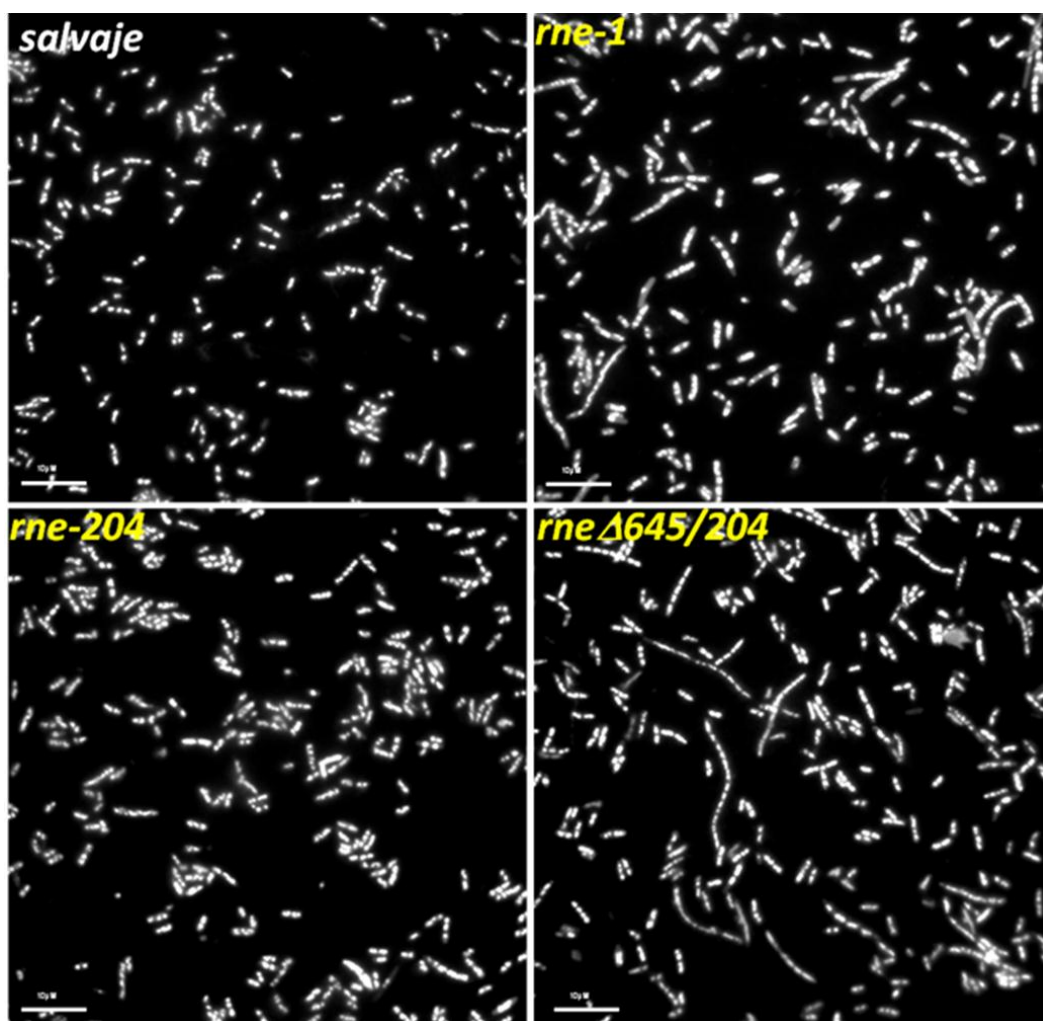


Figura 3.26. Fenotipo morfológico y distribución de los nucleoides de los diferentes mutantes a 37°C. Los cultivos de cada una de las cepas fueron iniciados mediante la inoculación de una colina en medio líquido. Las cepas fueron crecidas a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial y luego transferidas a 37°C durante 2 horas. Las muestras para su observación en el microscopio fueron preparadas tal y como se describe en materiales y métodos

A 44°C el 97% de la población de células del mutante *rneΔ645/204* mostraba un aspecto de filamentos largos y se podían contar hasta 35 nucleoides (Fig. 3.27 y 3.29)

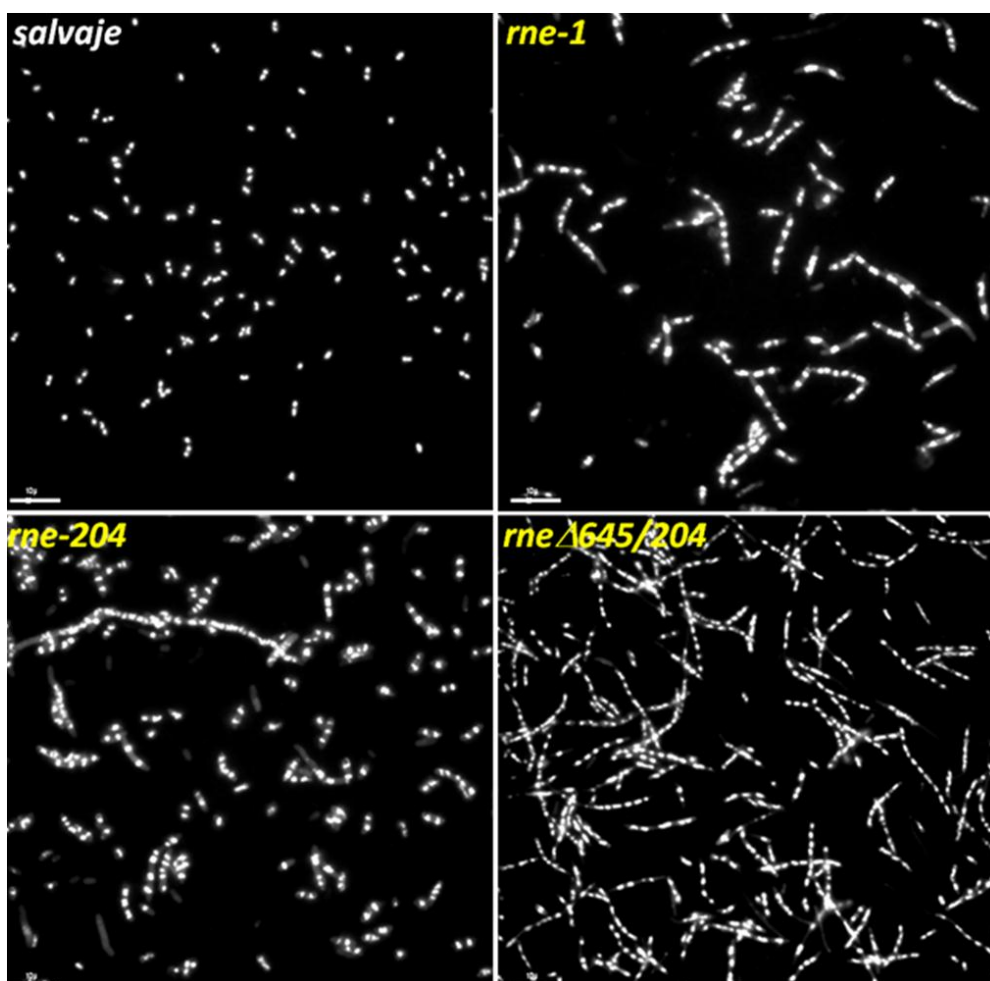


Figura 3.27. Fenotipo morfológico y distribución de los nucleoides de los diferentes mutantes a 44°C. Los cultivos de cada una de las cepas fueron iniciados mediante la inoculación de una colina en medio líquido. Las cepas fueron crecidas a 30°C hasta alcanzar la fase exponencial y luego transferidas a 44°C durante 2 horas. Las muestras para su observación en el microscopio fueron preparadas tal y como se describe en materiales y métodos

En el caso del mutante *rne-204*, la mayoría de la población presentaba una longitud de sus filamentos ligeramente superior a la observada a 37°C y alrededor de un 5% de la población presentaba un aspecto de filamentos largos, pero de menor tamaño a los encontrados en *rne645/204* y con un número de nucleoides de aproximadamente 17 (Fig. 3.28).

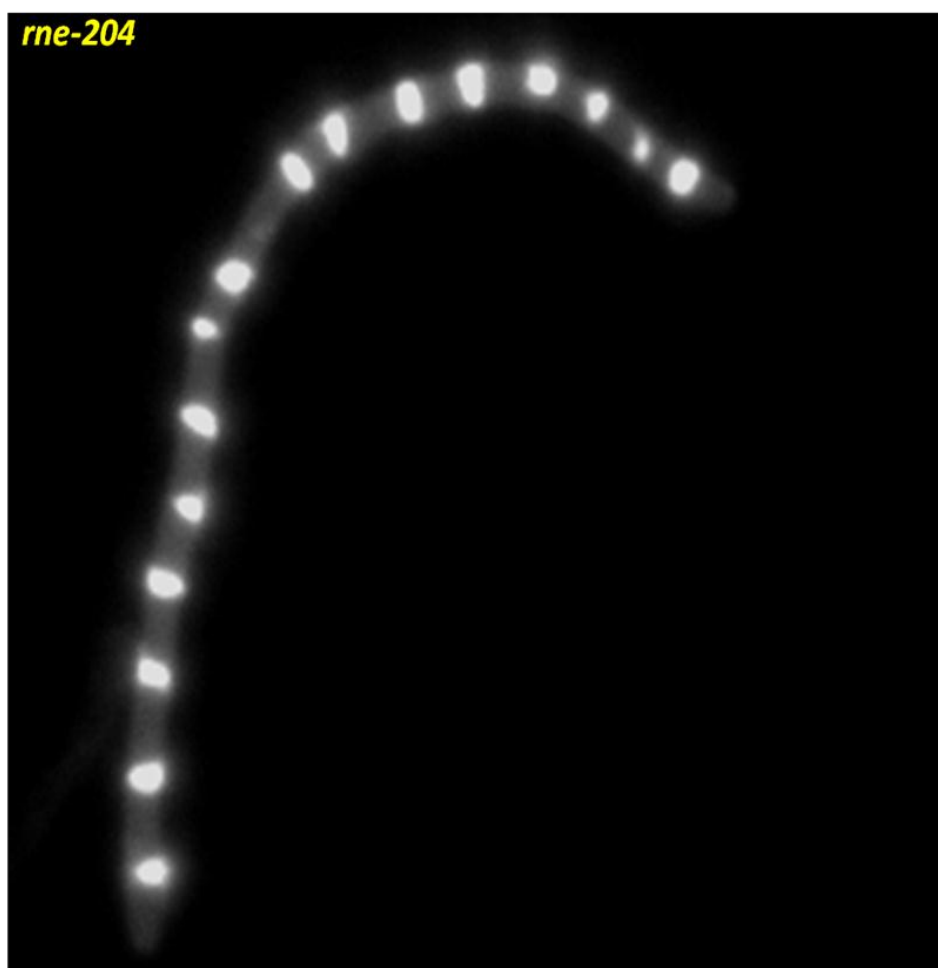


Figura 3.28. Detalle de la morfología celular y distribución de los nucleoides teñidos con DAPI del mutante *rne-204* a 44°C mediante análisis de microscopía fluorescente.

Como se puede observar en las figuras (Fig. 3.28 y 3.29) tanto el mutante *rne-204* y *rneΔ645/204* poseen un fenotipo filamentoso en donde no se observan puntos de constricción indicadores de citoquinesis, este fenotipo es similar al encontrado en el mutante termosensible *ftsZ*. En cambio, el mutante *rne-1* a 44°C mostraba el fenotipo filamentoso esperado, con una longitud de las células más homogénea comparada con el mutante *rne-204* y con una longitud media de sus filamentos también inferior. A diferencia del mutante *rne-204*, el mutante *rne-1* no presentaba una pequeña proporción de células con una longitud superior a la mayoría de las células. Esta diferencia en la longitud de los filamentos celulares de *rne-1* y *rne-204* puede estar

relaciona con un menor nivel de FtsZ en el mutante *rne-204* a 44°C (Fig. 3.24; comparar carriles 6 y 7 de FtsZ).

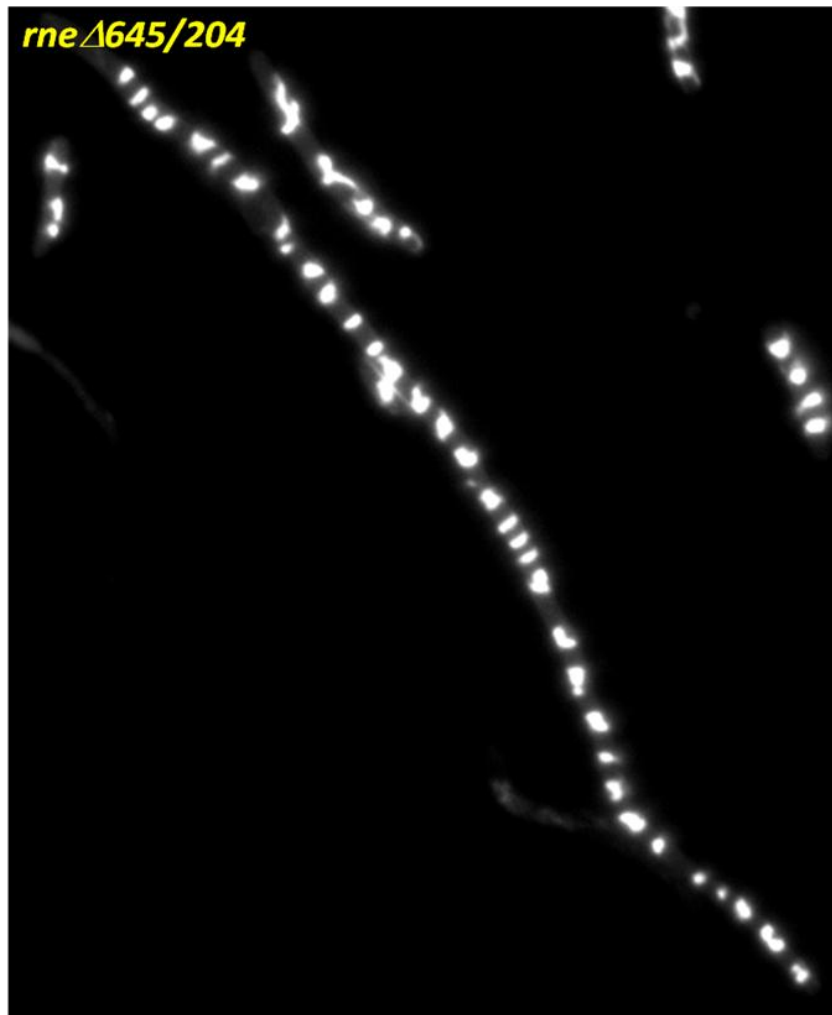


Figura 3.29. Detalle de la morfología celular y distribución de los nucleoides teñidos con DAPI del mutante *rne645/204* a 44°C mediante análisis de microscopía fluorescente.

Nuestros datos indican una relación entre la inactividad de la RNasa E y la inhibición de la citoquinesis, debido a una disminución de los niveles de FtsZ para generar los septos de división (Fig. 3.28 y 3.29) con lo cual se bloquea la división celular. Sin embargo, no hay una inhibición de la replicación del DNA.

3.21 Variaciones del ratio FtsZ/FtsA parecen no ser responsables del fenotipo celular filamentososo.

Estudios anteriores en otros laboratorios habían establecido una relación del ratio entre los niveles de expresión de FtsZ y FtsA con la morfología filamentososa de *E. coli*, puesto que el fenotipo celular filamentososo producido por la sobreexpresión de uno de los genes *ftsZ* o *ftsA* era suprimido por un incremento de la expresión del otro gen {Dai, 1992 #701}{Dewar, 1992 #710}. Por tanto, nosotros decidimos determinar los ratios FtsZ/FtsA de los diferentes mutantes termosensibles y compararlos con la cepa salvaje a 37°C y 44°C. Como se observa en la tabla 3.5 a 37°C los mutantes termosensible *rne-1* y *rne-204* presentan un ratio FtsZ/FtsA similar a la cepa salvaje, mientras el mutante *rneΔ645/204* presenta un ratio ligeramente inferior a la cepa salvaje.

Tabla 3.5. Longitudes celulares y ratios FtsZ/FtsA en los diferentes mutantes.

Cepa	longitud	Ratio FtsZ/FtsA		Δ FtsZ	Δ FtsA
	μm a 44 °C	37°C	44 °C		
<i>rne+</i>	1.65±0.47	1	1	100%	100%
<i>rneΔ645/204</i>	28.04±2.34	0.88	0.2	6.6%	27.77%
<i>rne-1</i>	14.37±1.27	1	0.90	48.46%	53.33%
<i>rne-204</i>	18.81±6.79	1	0.95	37.67%	46.66%

Sin embargo, los mutantes *rne-204* y *rne-1* incluso teniendo un ratio FtsZ/FtsA similar a la cepa salvaje presentan un fenotipo de morfología celular en forma de filamentos cortos. A 44°C el mutante *rne-1* presenta un ratio FtsZ/FtsA ligeramente inferior a la de la cepa salvaje (0.90) y unos niveles de FtsZ y FtsA que representan el 48.46 y 53.33 % respectivamente, de los niveles normales de FtsZ y FtsA de la cepa salvaje a 44°C. De forma similar el mutante *rne-204* presenta un ratio FtsZ/FtsA de 0.90 y unos niveles de FtsZ y FtsA que representan el 37.67% y 46.66 %

respectivamente, de los niveles normales de la cepa salvaje a 44°C. Por el contrario, el mutante *rneΔ645/204* presenta un ratio FtsZ/FtsA de 0.2 y unos niveles de FtsZ y FtsA que representan el 6.6 % y el 27.7% del nivel de la cepa salvaje (Fig 3.30).

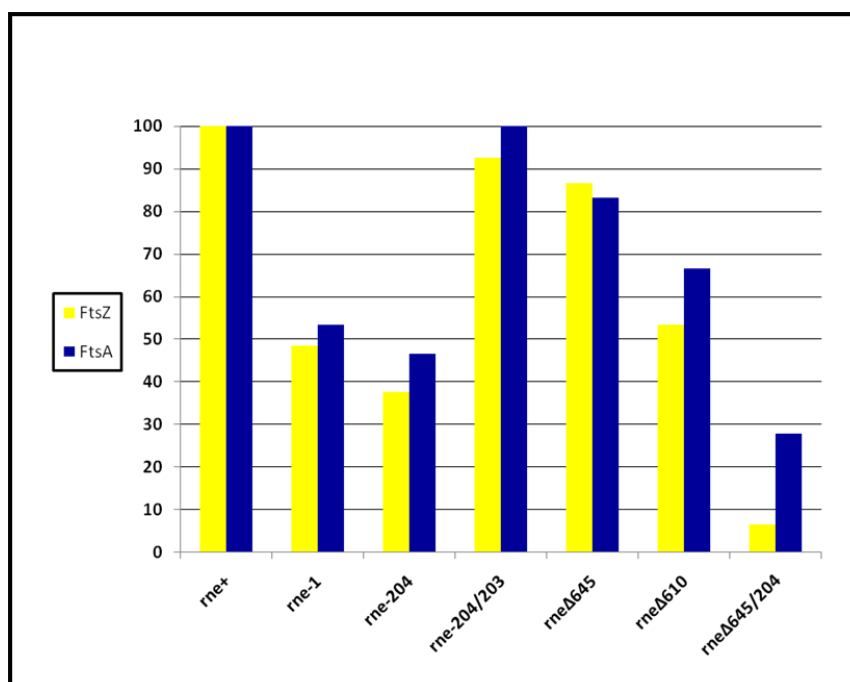


Figura 3.30. Porcentajes de expresión de FtsZ y FtsA de los diferentes mutantes con respecto a la cepa salvaje.

Todos los mutantes presentan un fenotipo filamentoso a 44°C, aunque difieren en la longitud celular (Tabla 3.5), así por ejemplo, los mutantes *rne-1* y *rne-204* presentan una longitud media de aproximadamente 14 y 19 μm respectivamente, mientras el mutante *rneΔ645/204* presentan una longitud media de 28 μm.

Discusión

5.1 Identificación de un nuevo mutante termosensible de la RNasa E.

Hasta el momento todo el conocimiento obtenido sobre la función de la RNasa E *in vivo* se ha basado principalmente en el análisis de los mutantes termosensibles *rne-1* y *rne-3071*, cuyas mutaciones mapean en el subdominio de unión al RNA S1 del dominio catalítico amino terminal {Arraiano, 1988 #31} {Bernstein, 2004 #59} {McDowall, 1993 #264} {Babitzke, 1991 #3}. En esta tesis se describe por primera vez, la caracterización *in vivo* de dos alelos mutantes termosensibles de la RNasa E, *rne-204* y *rneΔ645/204*, cuya mutación está localizada en el subdominio 5' sensor del dominio funcional de la RNasa E. Adicionalmente, describimos el aislamiento de un mutante supresor intragénico capaz de complementar la letalidad condicionada asociada a *rne-204*.

El alelo *rneΔ645*, que codifica para una forma truncada de la RNasa E de 417 aminoácidos, es capaz de mantener la viabilidad de *E. coli* {Ow, 2002 #17}. Por tanto, mutaciones en este alelo podrían darnos información acerca de los aminoácidos implicados en la actividad catalítica y/o reconocimiento del sustrato de la RNasa E. Mediante mutagénesis aleatoria *in vitro* del alelo *rneΔ645*, identificamos 6 mutantes puntuales termosensibles. Dichas mutaciones se localizaban en los diferentes subdominios del dominio funcional de la RNasa E (ver tabla 3.1 y Fig. 3.2). Sorprendentemente, al transferir dichas mutaciones mediante mutagénesis dirigida a la versión nativa de la RNasa E, solamente dos de ellos, el alelo *rne-68* y *rne-204*, mantenían el fenotipo termosensible, mientras el resto de los mutantes fueron capaces de crecer a 44°C. Puesto que el alelo termosensible *rne-68* era idéntico al *rne-3071*, el cual ya ha sido previamente caracterizado {Apirion, 1978 #152}, nosotros decidimos analizar *in vivo* la relevancia fisiológica de la mutación puntual de cambio de sentido Pro204Leu en la RNasa E de *E. coli*, ya que el subdominio 5' sensor ha sido propuesto ser importante para la actividad y reconocimiento del sustrato. Para ello, examinamos *in vivo* los principales defectos fenotípicos que han sido previamente asociados con la pérdida de la actividad de la RNasa E en los mutantes *rne-1* y *rne-3071*, cuyas mutaciones se localizan en el subdominio de unión al RNA S1 {Mudd, 1990 #486} {McDowall, 1993 #264}. Todos nuestros experimentos *in vivo* fueron realizados

con cepas de *E. coli*, las cuales portaban la delección de la copia cromosomal del gen *rne* y eran deficientes para eventos de recombinación debido a que portan el alelo mutante *recA56*. Por consiguiente, todos los resultados obtenidos en nuestros experimentos no pueden estar afectados por algún tipo de interacción entre los diferentes alelos del gen *rne* portados en plásmidos y el inactivado locus cromosómico *rne*.

Nuestro modelo bioinformático de la estructura del dominio catalítico amino terminal usando las bases de datos Prodom, pFAM y COG, estimó que además del ya conocido dominio de unión al RNA S1 localizado entre los aminoácidos 35-125, había otro dominio localizado entre los aminoácidos 147-392 compuesto de una serie de estructuras secundarias formada de varias hélices α y hojas β alternantes conectadas por lazos. El plegamiento de esta región resultó en una estructura tipo barril TIM, donde el residuo de prolina 204 se localiza en el inicio de una hoja beta dentro del subdominio 5' sensor (ver Fig. 3.3). Según este modelo, el sitio catalítico y, posiblemente, la superficie de dimerización deberían de estar formados por residuos en las regiones de los lazos que conectan las α hélices y hojas β . Por tanto, mutaciones en estas regiones podrían afectar la catálisis y/o la dimerización de la RNasa E. La posterior resolución cristalina del dominio amino terminal de la RNasa E por Callaghan y col {Callaghan, 2005 #250} confirmó nuestras estimaciones, ya que reveló que efectivamente la Prolina 204 está localizada en el inicio de una hoja β . Además, la estructura cristalina revela que esta prolina 204, esencial para la actividad de la RNasa E, no interacciona directamente con el extremo 5' del sustrato de RNA (ver Fig. 1.14). Entonces, y ya que el subdominio 5' sensor está implicado en la interacción con el sustrato, esta sustitución puede generar un cambio estructural local capaz de alterar la conformación del bolsillo de reconocimiento del extremo 5' del RNA mediante la alteración de la posición relativa de los aminoácidos que interaccionan directamente con el RNA sustrato a 44°C o puede impedir el cambio conformacional necesario para organizar el sitio catalítico. Sin embargo, este cambio estructural provocado por el cambio Pro204Leu a 44°C puede ser compensado con una mutación en el aminoácido 203 generando el cambio Ala→Gly.

5.2 El mutante termosensible *rne-204* de *E. coli* es un nuevo modelo de estudio de la actividad de la RNasa E *in vivo*.

El nuevo mutante termosensible *rne-204* de *E. coli* muestra un fenotipo muy similar al de la cepa salvaje cuando crece a la temperatura permisiva de 37°C en cuanto a su tiempo de duplicación (ver tablas 3.2 y 3.3), capacidad de madurar los tRNA^{Cys}, tRNA^{His}, tRNA^{Pro} y tRNA^{Asp} (ver Fig. 3.10 y 3.11), procesar el 9S rRNA en 5S rRNA (ver Fig. 3.7) y capacidad de autorregular la expresión de la RNasa E (ver Fig. 3.15 y 3.16). Este comportamiento contrasta con los defectos fenotípicos parciales observados a 37°C en los dos únicos mutantes termosensibles *rne-1* y *rne-3071* encontrados hasta la fecha {Ono, 1979 #764} {Apirion, 1978 #152}. Sin embargo, a 44°C el mutante termosensible *rne-204* muestra un fenotipo similar al mutante termosensible *rne-1*, en relación al procesamiento del 9S rRNA y la autorregulación, una ligera eficiencia en el procesamiento de los tRNAs analizados y una vida media de los mRNA analizados ligeramente superior. Por tanto, al ser más marcadas las diferencias entre los defectos fenotípicos mostrados a la temperatura permisiva y no permisiva en el mutante *rne-204* hace que este mutante sea un mejor modelo para estudiar la acción de la RNasa E *in vivo*. El mutante revertante *rne-204/203* fue capaz de complementar todos los defectos fenotípicos asociados con la pérdida de la actividad de la RNasa E. Específicamente, la viabilidad a 44°C, la maduración de tRNA^{Cys}, tRNA^{His}, tRNA^{Pro} y tRNA^{Asp}, el procesamiento de 9S rRNA en 5S rRNA, la restauración de la autoregulación y la estabilidad de varios mRNAs, fueron retornados a los valores normales encontrados en la cepa salvaje. Nuestra hipótesis, teniendo en cuenta todos estos resultados, es que la mutación Ala203Gly suprime la incapacidad de crecimiento a 44°C asociada al alelo *rne-204* y es capaz de restaurar todos los defectos asociados con la inactividad de la RNasa E, ya que funciona en parte restaurando la habilidad del 5' sensor para interaccionar normalmente con el RNA sustrato o permitir el cambio conformacional necesario para organizar el sitio catalítico. Esta conjetura está basada en el hecho de que la mutación supresora se localiza dentro del subdominio 5' sensor y afecta al aminoácido anterior del alterado en el alelo *rne-204*.

5.3 El degradosoma está implicado en la autorregulación y degradación del mRNA.

Solamente el dominio amino terminal es esencial para la supervivencia de *E. coli* {Ow, 2002 #17; Ow, 2000 #4}. Sin embargo, los mutantes *rne*Δ645, *rne*Δ610 y *rne*Δ645/204 muestran tiempos de generación mayores a la cepa control a 37°C (ver Tablas 3.2 y 3.3). A esa misma temperatura no observamos diferencias en el procesamiento del 9S rRNA (ver Fig. 3.6). En contraste, el procesamiento de tRNA por parte de las diferentes versiones truncadas de la RNasa E es defectuosa incluso en el alelo mutante *rne*Δ645, el cual es viable a 44°C. Además, los alelos *rne*Δ645 y *rne*Δ645/204 presentan tasas de vida media de los mRNAs examinados a 44°C que oscilan entre 1.3-6.5 y 1.9-7.4 veces respectivamente, con respecto al alelo salvaje, mientras las diferencias de vida media de los mismos transcritos analizados entre los alelos *rne*Δ645 y *rne*Δ645/204 oscilan entre 1 y 3.2 veces. Aunque los mRNAs examinados aquí fueron solamente una pequeña muestra del transcriptoma de *E. coli*, ellos representan sustratos *in vivo* de la RNasa E bien caracterizados. Todos estos datos sugieren que la región C-terminal, y consecuentemente el degradosoma, no es esencial para la supervivencia de la bacteria ni requerida en la maduración del 5S rRNA (ver Fig. 3.7), pero si es necesaria en el procesamiento normal de los tRNAs (ver Fig. 3.8 y 3.9) y en la degradación de los mRNAs (Tabla 3.4). Por otro lado, todas las diferencias encontradas entre los resultados de los alelos *rne*Δ645 y *rne*Δ645/204 a 44°C sugieren que el subdominio 5' sensor es esencial para la actividad de la RNasa E y/o reconocimiento de los sustratos. Sin embargo, el incremento de la estabilidad encontrado en el mutante *rne*Δ645 a 44°C es igual o inferior al de los mutante termosensible *rne*-1 y *rne*-204. Por su parte, el mutante *rne*-204 muestra en todo los transcritos analizados unos valores de vida media ligeramente superior, pero reproducibles, al mutante *rne*-1. Esto puede sugerir una importante implicación del dominio 5'sensor en la degradación del mRNA y/o en el reconocimiento de los mRNAs, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos por Perwez y colaboradores {Perwez, 2008 #18} en donde describen que una segunda mutación localizada en el

subdominio 5' sensor es capaz de revertir los defectos en los procesos de maduración de los tRNAs y rRNA, pero no de la degradación del mRNA en los mutantes termosensibles *rne-1* y *rne-3071*. Adicional soporte para esta hipótesis ha sido la identificación en *E. coli* de la RNA 5' pirofosfohidrolasa (RppH), codificada por el gen *rppH* {Deana, 2008 #33} capaz de generar extremos 5' monofosfato en el RNA y que la actividad de la RNasa E es estimulada por la presencia de un 5' fosfomonoéster en el extremo 5' del sustrato y fuertemente inhibida por grupos trifosfatos terminales.

En los mutantes truncados se aprecia una pérdida de la autorregulación con respecto a la cepa salvaje puesto que se observa un incremento muy significativo de los niveles de proteína al compararlos con el alelo salvaje *rne* a 37°C (ver Fig. 3.12 y 3.13). Debido a que estos mutantes truncados presentan la misma región 5'UTR que la cepa salvaje *rne*, la pérdida de la autorregulación parece estar más relacionada con la hipótesis de que la ausencia de la región C-terminal de los mutantes truncados provoca una significativa pérdida de la capacidad para cortar *in vivo* en la región 5'UTR del mRNA de *rne*. Por tanto, esto indica que el degradosoma tiene un papel importante en la autorregulación de los niveles de expresión de la RNasa E, debido probablemente a que aumenta la eficacia de degradación de los mRNAs. A 44°C, y a diferencia de lo que ocurría en el mutante termosensible *rneΔ610*, se observó una reducción de los niveles de expresión del alelo *rneΔ645/204* con respecto al alelo *rneΔ645* (ver Fig. 3.12 y 3.13), lo cual podría indicarnos en principio, que la proteína RneΔ645/204 es inestable y termolábil, ya que existen diversos trabajos que relacionan mutaciones puntuales de la prolina con pérdida de la termoestabilidad. Sin embargo, a nivel de transcripción se observó un incremento llamativo del mRNA del alelo *rneΔ645/204* muy superior al de *rneΔ645* y *rneΔ610* en crecimiento equilibrado a 44°C (ver Fig. 3.14). Por tanto, si tenemos en cuenta el gran defecto observado en el procesamiento de los tRNA en el mutante *rneΔ645/204*, una reducción de la síntesis de proteínas debido a la carencia de tRNAs maduros para soportar la normal biosíntesis de proteína sería una hipótesis más plausible para explicar la reducción de los niveles de RneΔ645/204.

5.4 Implicación de la RNasa E en la división celular.

Nuestros resultados sugieren que los niveles de expresión de las proteínas FtsZ y FtsA están regulados en parte por la acción de la RNasa E, ya que todos los mutantes termosensibles de la RNasa E analizados a 44°C muestran unos niveles inferiores de las proteínas FtsZ y FtsA al compararla con la cepa salvaje (ver Fig. 3.23 y 3.24; tabla 3.5). En particular, al aumentar la temperatura de crecimiento de *E. coli*, de 37°C a 44°C, se observa un incremento de la expresión de FtsZ y FtsA en la cepa salvaje *rne* y en los mutantes *rne* Δ 645 y *rne*-204/203, mientras que se observa un descenso de los niveles de FtsZ y FtsA en los mutantes *rne* Δ 645/204 y *rne*-204 (ver Fig. 3.23 y 3.24). Sin embargo, en los mutantes *rne*-1 y *rne* Δ 610 se observa un descenso sólo de los niveles de FtsZ, ya que los de FtsA se mantienen constantes (ver Fig. 3.23 y 3.24). Curiosamente, y al contrario de lo que ocurre en el mutante *rne*-204, el mutante *rne*-1 muestra a 37°C niveles de la FtsZ y FtsA ligeramente inferiores comparados con la cepa salvaje, lo cual puede estar relacionado con una actividad parcial de la RNasa E en este mutante {Jain, 1995 #46} como consecuencia de una mayor sensibilidad a la temperatura del mutante *rne*-1 con respecto a *rne*-204. Otro aspecto a destacar es que el mutante termosensible *rne* Δ 610 presenta unos niveles de FtsA y FtsZ superiores a *rne* Δ 645/204, pero inferiores a *rne* Δ 645. Esta diferencia entre los mutantes termosensibles *rne* Δ 610 y *rne* Δ 645/204 puede estar relacionada con que el mutante *rne* Δ 610 es menos sensible a la temperatura, ya que su crecimiento a la temperatura de 44°C se detiene a las 4 horas (ver tabla 3.3). Además, el hecho de que los niveles de las proteínas FtsA y FtsZ en el mutante *rne* Δ 645 sean ligeramente inferiores a la cepa salvaje *rne* sugiere que la formación del degradosoma, es necesaria para alcanzar los niveles normales de las proteínas FtsA y FtsZ. Todos estos datos indican que los incrementos observados de los niveles de expresión de FtsZ y FtsA a 44°C de la cepa salvaje *rne* (ver Fig. 3.23 y 3.24) no pueden ser explicados solamente con un aumento de la transcripción a esta temperatura.

En el caso de *Bacillus subtilis*, que presenta una organización génica similar de los genes implicados en la división celular de *E. coli*, solamente se detecta mediante northern blot una banda de policistrónica de 2.5kb, incluyendo *ftsA* y *ftsZ* {Gholamhoseinian, 1992 #718}. Sin embargo, cuando realizamos el northern blot correspondiente (ver Fig. 3.25) aparecieron dos bandas correspondientes a los transcritos policistrónicos *ftsQAZ* y *ftsAZ*. La estabilidad de ambos transcritos policistrónicos en el mutante termosensible *rne-204* es de 2.26 veces superior, mientras en el mutante *rne-1* es 1.75 veces al compararlo con la cepa salvaje a 44°C (ver Fig. 3.25). Sin embargo, Cam y colaboradores {Cam, 1996 #482} obtuvieron unos valores de vida media de más de 16 minutos cuando se inactivaba la RNasa E, mientras en nuestro caso oscilan entre 7 y 10 minutos, esto puede estar relacionado con el tipo de mutante termosensible utilizado, ya que ellos usaron el mutante *rne-3071*, o/y con la metodología aplicada para determinar la vida media.

Los resultados obtenidos mediante Western y Northern blot, indican una regulación postranscripcional de la RNasa E en la expresión de FtsZ y FtsA (ver Fig. 3.23, 3.24 y 3.25). La hipótesis más sencilla, para explicar estos resultados sería: una vez la RNasa E corta en la región intercistrónica *ftsA-ftsZ*, genera un mRNA *ftsZ* monocistrónico, el cual sería traducido eficientemente y degradado rápidamente, algo similar podría ocurrirle a *ftsA*. Sin embargo, la no detección mediante northern blotting del mRNA monocistrónico de *ftsZ* generado durante la maduración, sugiere otra posibilidad relacionada con la acción de la RNasa E para degradar algún sRNA inhibidor de la traducción. Un candidato podría ser el sRNA *dicF*, el cual ha sido caracterizado como un antisentido capaz de inhibir la división celular mediante el bloqueo de la traducción de *ftsZ* {Tetart, 1992 #716}. Sin embargo, esta posibilidad es muy poco probable debido a que la maduración de *dicF* es RNasa E dependiente. Otro candidato, es un RNA antisentido de la transcripción de *ftsZ* denominado *stfZ*, el cual es complementario a parte de la región 5' codificante de *ftsZ* y a la región intercistrónica *ftsZ-ftsA* pudiendo inhibir la transcripción y traducción de *ftsZ* cuando *stfZ* está presente en un alto número de copias {Dewar, 1993 #715}. El *stfZ* antisentido se transcribe desde la hebra complementaria desde un segmento de DNA de 490 nucleótidos que codifica para la porción final del gen *ftsA*, la región intercistrónica y

región inicial del gen *ftsZ*. Además, este gen también posee un potencial promotor antisentido y un terminador antisentido de la transcripción {Dewar, 1993 #715}, y por tanto, podría codificar un potencial polipéptido de 25 aminoácidos. Una misteriosa característica de los sRNA antisense *dicF* y *stfZ* es que ninguno de ellos es capaz de inhibir la división celular excepto cuando ellos son sobreexpresados a altas temperaturas {Dewar, 1993 #715}.

5.5 Implicación de la RNasa E en la morfología.

A diferencia de la cepa salvaje, aproximadamente un 20% de la población del mutante *rne-1* mostraba una morfología celular de filamentos cortos (ver Fig. 3.26) conteniendo un número de nucleoides comprendido entre 5-10 a 37°C. Esta anomalía fenotípica del mutante *rne-1* puede estar relacionada con un menor nivel de las proteína FtsZ y/o FtsA a 37°C (ver Fig. 3.24; carril 2), lo cual está de acuerdo con resultados anteriores que relacionan una morfología filamentosa con valores inferiores al nivel normal de FtsZ en *E. coli* {Dai, 1991 #697} {Takada, 2005 #268}. Por tanto, un nivel inferior de FtsZ a 37°C debido a una inactivación parcial de la RNasa E a 37°C en el mutante *rne-1* podría explicar esta diferencia fenotípica. En el caso del mutante *rneΔ645/204*, la mayor parte de la población mostraba una morfología de filamentos cortos similar a la del mutante *rne-1*, pero alrededor de un 15% de la población presentaba un aspecto de filamentos largos conteniendo un número de nucleoides comprendido entre 10-17 (ver Fig. 3.26). Sin embargo, en este caso, la diferencia de la longitud de los filamentos entre estos dos mutantes, *rne-1* y *rneΔ645/204*, no parece estar relacionada con diferencias de los niveles de las proteínas FtsZ y FtsA, ya que a 37°C los niveles de estas proteínas en el mutante *rneΔ645/204* son similares al mutante *rne-1* (ver Fig. 3.23; carril 2 y 3.24; carril 2). A diferencia del mutante *rneΔ645/204*, el mutante *rne-1* posee el denominado domino citoesquelético, el cual comprende los aminoácidos 418-602, requeridos para su organización en filamentos helicoidales de la RNasa E a lo largo de toda la longitud de la célula. Estudios de microscopía de mutantes expresando versiones truncados de la RNasa E han

demostrado que la pérdida de este dominio citoesquelético de la RNasa E está asociado a una disminución de la tasa de crecimiento, división celular anormal y una morfología filamentosa, a pesar de la presencia del esencial dominio catalítico funcional {Taghbalout, 2007 #719}. Por tanto, la ausencia del dominio citoesquelético en el mutante *rneΔ645/204* puede explicar el fenotipo filamentoso más pronunciado en este mutante.

El mutante *rneΔ645/204* es capaz de formar colonias a 37 °C en placas de agar, lo cual está de acuerdo con los resultados de Tamura y colaboradores {Tamura, 2006 #55} que demostraban que el fenotipo filamentoso de *E. coli* no está relacionado con la incapacidad de formar colonias. En concordancia con esta observación también se ha visto en *Streptomyces coelicolor*, que *ftsZ* es requerido para la septación, pero no para la viabilidad celular {Schwedock, 1997 #712}. En el caso del mutante *rne-204*, muestra una morfología más elongada que la cepa salvaje, pero menor que el mutante *rne-1* (ver Fig. 3.26). Este resultado fue inesperado porque a 37°C el mutante *rne-204* mostraba una tasa de crecimiento (ver tablas 3.2 y 3.3) y unos niveles de FtsZ y FtsA (ver Fig. 3.24) similares a la cepa salvaje, con lo cual no esperamos ver, a priori, ninguna diferencia fenotípica. La población de células presentaba un aspecto de filamentos cortos en los que se podía apreciar un máximo de 5 nucleoides. A 44°C el 97% de la población de células del mutante *rneΔ645/204* mostraba un aspecto de filamentos largos y se podían contar hasta 35 nucleoides (ver Fig. 3.27 y 3.29). En el caso del mutante *rne-204*, la mayoría de la población presentaba una longitud de sus filamentos ligeramente superior a la observada a 37°C y alrededor de un 5% de la población presentaba un aspecto de filamentos largos, pero de menor tamaño a los encontrados en *rneΔ645/204* y con un número de nucleoides de aproximadamente 17 (ver Fig. 3.29 y 3.28). Como se puede observar en las figuras 3.28 y 3.29 tanto el mutante *rne-204* y *rneΔ645/204* poseen un fenotipo filamentoso en donde no se observan puntos de constricción indicadores de citoquinesis, este fenotipo es similar al encontrado en el mutante termosensible *ftsZ* {Dai, 1991 #697}. En cambio, el mutante *rne-1* a 44°C mostraba el fenotipo filamentoso esperado, con una longitud de las células más homogénea comparada con el mutante *rne-204* y con una longitud media de sus filamentos también inferior (ver tabla 3.5). A diferencia del mutante *rne-204*, el

mutante *rne-1* no presentaba una pequeña proporción de células con una longitud superior a la mayoría de las células. Esta diferencia en la longitud de los filamentos de *rne-1* y *rne-204* puede estar relacionada con un menor nivel de FtsZ en el mutante *rne-204* a 44°C. La integración de estos datos indican una relación entre la inactividad de la RNasa E y la inhibición de la citoquinesis, debido a una disminución de los niveles de FtsZ para generar los septos de división. Sin embargo, esta inhibición de la citoquinesis no está acompañada de una inhibición de la replicación del DNA.

Por otro lado, Tamura y colaboradores observaron una disminución del ratio FtsZ/FtsA debido a un aumento de los niveles de FtsA durante la inactivación de la RNasa E con respecto a la cepa salvaje y la asociaron con el fenotipo filamentoso {Tamura, 2006 #55}. Sin embargo, ellos no explicaban por qué una cepa de *E. coli* con el gen *rne* deletado y complementado con la RNasa G mostraban un fenotipo filamentoso, pero con un ratio FtsZ/FtsA idéntico a la cepa salvaje {Tamura, 2006 #55}. En nuestro caso, no observamos diferencias significantes en los ratios FtsZ/FtsA a 37°C **(ver tabla 3.5)** donde la RNasa E de los mutantes termosensibles muestran actividad total (*rne-204*) o al menos parcial (*rne-1* y *rneΔ645/204*) con respecto a la cepa salvaje. A la temperatura de 44°C los ratios FtsZ/FtsA para la cepa salvaje, *rneΔ645* y el mutante revertante *rne-204/203* fueron similares con valores comprendidos entre 0.9 y 1, pero sorprendentemente en el resto de los mutantes no se observaron diferencias muy significativas respecto a la cepa salvaje excepto para la cepa *rneΔ645/204*, que presentan un ratio de 0.2 (ver tabla 3.5). A diferencia de la cepa *rneΔ645/204*, la cual muestra un fenotipo filamentoso a 44°C (ver Fig. 3.27) y una disminución del ratio FtsZ/FtsA, los mutantes termosensibles *rne-1* y *rne-204* a 44°C y el *rneΔ645/204* a 37°C, presentan un fenotipo filamentoso (ver Fig. 3.26 y 3.27), pero no una disminución significativa del ratio FtsZ/FtsA. Por tanto, nuestros resultados sugieren que el fenotipo filamentoso de *E. coli* observado cuando la RNasa E se inactiva es una consecuencia, principalmente, del descenso de los niveles de FtsZ (aunque también podría ser de FtsA) por debajo de un nivel mínimo para poder dividirse la célula de forma normal más que debido a una disminución del ratio FtsZ/FtsA por un aumento del nivel de FtsA como propone Tamura y colaboradores {Tamura, 2006 #55}. Nuestra hipótesis estaría de acuerdo con el fenotipo filamentoso

observado en los mutantes termosensibles de *ftsZ* o *ftsA* de *E. coli*, lo cual indica el requerimiento de unos niveles mínimo de expresión de FtsA y FtsZ para que la división celular tenga lugar de forma adecuada.

5.6 ¿Cuál es la función celular esencial de la RNasa E?

El procesamiento del precursor 9S rRNA fue similar, dentro del error experimental, en los mutantes *rne-1*, *rneΔ645/204* y *rne-204*, pero no ocurrió lo mismo para el mutante *rneΔ610* (ver Fig 3.7). Sin embargo, a pesar de que los mutantes *rne-1*, *rneΔ645/204*, *rne-204* y *rneΔ610* detienen su crecimiento a 44°C, el procesamiento del 9S rRNA fue casi normal en el mutante *rneΔ610*, lo cual sugiere que el procesamiento del precursor 9S rRNA no es la función esencial realizada por la RNasa E. En el caso de la degradación del mRNA, el mutante *rneΔ645* viable a 44°C presentan tasas de vida media de los mRNAs analizados a 44°C que oscilan entre 1.3-6.5 con respecto al alelo salvaje, mientras que en el caso del mutante termosensible *rneΔ645/204* los valores de vida media varían entre 1.9-7.4 veces. Estas ligeras diferencias en las vidas medias de los transcritos analizados entre los mutantes *rneΔ645* y *rneΔ645/204* no permiten mantener la idea de que la inviabilidad celular esté asociada a la degradación del mRNA.

Los resultados obtenidos en el presente estudio utilizando diferentes mutantes de la RNasa E nos ha permitido a nosotros sugerir que *in vivo* el procesamiento del tRNA es la razón más probable por la cual la RNasa E es esencial para la viabilidad celular. ¿Qué evidencias soportan a esta conclusión? En primer lugar, se observa una relación directa entre los tiempos de generación y propiedades de crecimiento con los defectos en el procesamiento del tRNA y cantidades relativas de los tRNA maduros presentes en los diferentes mutantes analizados (ver Fig. 3.8, 3.9, 3.10 y 3.11, y tablas 3.2 y 3.3). En segundo lugar, el mutante *rneΔ645/204* muestra a 44°C unos niveles de expresión de RneΔ645/204 inferiores a los de RneΔ645 y RneΔ610 a pesar que los niveles de mRNA de *rneΔ645/204* son significativamente mayores a los mRNAs de *rne*, *rneΔ645* y *rneΔ610*. Además, los niveles de expresión de FtsZ y FtsA disminuyen en los

mutantes termosensibles *rne-1* y *rne-204* a pesar de que las vidas medias de sus mRNAs son mayores que en la cepa salvaje.

Asumiendo dicha hipótesis nosotros podemos plantear un modelo para explicar el comportamiento de los mutantes *rneΔ645/204* y *rne-204*. Un cultivo de *E. coli* crece exponencialmente debido a que cada una de las células produce el material necesario para el crecimiento y también nueva maquinaria celular para mantener dicho crecimiento. Esta última capacidad es bloqueada por la inactivación de la RNasa E, ya que la célula no puede sintetizar eficientemente 5S rRNA y tRNAs maduros, lo cual provoca que no se produzcan nuevos ribosomas y tRNAs para participar en la síntesis de proteína. De modo que cuando los mutantes termosensibles de la RNasa E son cambiados a la temperatura de 44°C, la RNasa E se inactiva y la células sólo pueden depender de los ribosomas y tRNAs preexistentes. Todos los procesos celulares se verán afectados incluida la división celular debido a la carencia de proteínas necesarias para el correcto funcionamiento del metabolismo celular. Entonces es razonable asumir que los mutantes termosensibles de la RNasa E crecen sólo linealmente justo después de la inactivación de la RNasa E, como se puede observar en las de curvas de crecimiento y viabilidad (ver Fig. 3.5), mientras que el pequeño incremento de absorbancia observado durante este periodo puede ser atribuido al aumento de la longitud de las células que adoptan un fenotipo filamentoso.

Es importante destacar que otra posible función esencial no puede ser inequívocamente descartada en este momento. Por ejemplo, la incapacidad de la RNasa E para procesar o degradar uno de los muchos RNA pequeños reguladores de la células que podrían estar implicados en una ruta esencial del metabolismo o resultar tóxicos debido a la desregulación de alguna proteína cuyos valores intracelulares están bajo estricto control. Otra potencial explicación podría estar relacionada con el papel estructural que le ha sido asignada a la RNasa E. La RNasa E fue identificada inmunológicamente por un anticuerpo contra la proteína tipo actina Hmp-1 {Casaregola, 1992 #373}. Además, se ha sugerido que la RNasa E forma estructuras tipo helicoidal como parte del citoesqueleto de la célula {Taghbalout, 2007 #719}. Por tanto, es concebible que la RNasa E es necesaria para la formación del citoesqueleto lo cual es esencial para la viabilidad de la célula, aunque la existencia de los alelos

truncados *rneΔ645*, *rneΔ610* y *rneΔ645/204* descarta esta hipótesis. Por último, debería ser resaltado que el papel esencial de la RNasa E en la maduración del tRNA no es mutuamente excluyente otra adicional y crítica función/es para la enzima.

Conclusiones

Conclusiones.

A continuación se describen las principales conclusiones de la presente tesis doctoral:

1. El mutante *rne-204* es el primer mutante termosensible, cuya mutación mapea en la secuencia que codifica para el subdominio 5' sensor dentro del dominio catalítico de la RNasa E.
2. El residuo de Pro204 está localizado en el inicio de una hoja beta, que parece ser esencial para la actividad y/o unión al RNA sustrato de la RNasa E.
3. El mutante *rne-204* y *rneΔ645/204* presenta importantes defectos en el metabolismo general del RNA.
4. Se observa una relación directa entre propiedades de crecimiento y defectos en el procesamiento del tRNA en los diferentes mutantes de la RNasa E. Esto sugiere que la función esencial de la RNasa E es el procesamiento de los extremos 3' de los tRNA.
5. El mutante *rneΔ645/204* posee una deficiencia significativa en la expresión de todas las proteínas analizadas, lo cual puede estar relacionado directamente con el gran defecto observado en el procesamiento del tRNA.
6. El degradosoma no es esencial para la viabilidad de *E. coli*, pero está implicado en el óptimo procesamiento del tRNA, degradación de mRNA, autorregulación, correcta división celular y morfología celular. Sin embargo, no es necesario para el procesamiento del 9S rRNA.
7. Los defectos observados en los mutantes *rne-204* y *rneΔ645/204* en la división celular parecen estar más relacionados con descensos globales de FtsA y FtsZ que con descensos del ratio FtsA/FtsZ.
8. La inactivación de la RNasa E provoca una inhibición de la citocinesis, pero no de la cariocinesis, dando lugar a morfologías celulares alargadas y multinucleadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe H, Aiba H (1996) Differential contributions of two elements of rho-independent terminator to transcription termination and mRNA stabilization. *Biochimie* **78**: 1035-1042
- Aiba H (2007) Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Current opinion in microbiology* **10**: 134-139
- Allemand F, Mathy N, Brechemier-Baey D, Condon C (2005) The 5S rRNA maturase, ribonuclease M5, is a Toprim domain family member. *Nucleic acids research* **33**: 4368-4376
- Altman S, Kirsebom, L. and Talbot, S. (1995) Recent Studies of RNase P. In *tRNA: structure, biosynthesis, and function*, Söll DaR, U. (ed), pp 67-78. Washington, DC: American Society for Microbiology Press
- Altuvia S, Locker-Giladi H, Koby S, Ben-Nun O, Oppenheim AB (1987) RNase III stimulates the translation of the cIII gene of bacteriophage lambda. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 6511-6515
- Apirion D (1978) Isolation, genetic mapping and some characterization of a mutation in Escherichia coli that affects the processing of ribonucleic acid. *Genetics* **90**: 659-671
- Apirion D (1980) Genetic mapping and some characterization of the rnpA49 mutation of Escherichia coli that affects the RNA-processing enzyme ribonuclease P. *Genetics* **94**: 291-299
- Apirion D (1983) RNA processing in a unicellular microorganism: implications for eukaryotic cells. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **30**: 1-40
- Apirion D, Dallmann G, Miczak A, Szeberenyi J, Tomcsanyi T (1986) Processing and decay of RNA in Escherichia coli: the chicken and egg problem. *Biochemical Society transactions* **14**: 807-810
- Apirion D, Gegenheimer P (1981) Processing of bacterial RNA. *FEBS letters* **125**: 1-9
- Apirion D, Gitelman DR (1980) Decay of RNA in RNA processing mutants of Escherichia coli. *Mol Gen Genet* **177**: 339-343
- Apirion D, Lassar AB (1978) A conditional lethal mutant of Escherichia coli which affects the processing of ribosomal RNA. *The Journal of biological chemistry* **253**: 1738-1742
- Apirion D, Miczak A (1993) RNA processing in prokaryotic cells. *Bioessays* **15**: 113-120
- Apirion D, Neil J, Ko TS, Watson N (1978) Metabolism of ribosomal RNA in mutants of Escherichia coli doubly defective in ribonuclease III and the transcription termination factor rho. *Genetics* **90**: 19-35
- Apirion D, Watson N (1980) A second gene which affects the RNA processing enzyme ribonuclease P of Escherichia coli. *FEBS letters* **110**: 161-163
- Aristarkhov A, Mikulskis A, Belasco JG, Lin EC (1996) Translation of the adhE transcript to produce ethanol dehydrogenase requires RNase III cleavage in Escherichia coli. *Journal of bacteriology* **178**: 4327-4332
- Armitage B, Koch T, Frydenlund H, Orum H, Schuster GB (1998) Peptide nucleic acid (PNA)/DNA hybrid duplexes: intercalation by an internally linked anthraquinone. *Nucleic acids research* **26**: 715-720
- Armitage B, Ly D, Koch T, Frydenlund H, Orum H, Batz HG, Schuster GB (1997) Peptide nucleic acid-DNA duplexes: long range hole migration from an internally linked anthraquinone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 12320-12325
- Arnold TE, Yu J, Belasco JG (1998) mRNA stabilization by the ompA 5' untranslated region: two protective elements hinder distinct pathways for mRNA degradation. *RNA (New York, NY)* **4**: 319-330
- Arraiano C, Yancey SD, Kushner SR (1993) Identification of endonucleolytic cleavage sites involved in decay of Escherichia coli trxA mRNA. *Journal of bacteriology* **175**: 1043-1052

- Arraiano CM, Cruz AA, Kushner SR (1997) Analysis of the in vivo decay of the Escherichia coli dicistronic pyrF-orfF transcript: evidence for multiple degradation pathways. *Journal of molecular biology* **268**: 261-272
- Arraiano CM, Yancey SD, Kushner SR (1988) Stabilization of discrete mRNA breakdown products in ams pnp rnb multiple mutants of Escherichia coli K-12. *Journal of bacteriology* **170**: 4625-4633
- Asai T, Condon C, Voulgaris J, Zaporozets D, Shen B, Al-Omar M, Squires C, Squires CL (1999) Construction and initial characterization of Escherichia coli strains with few or no intact chromosomal rRNA operons. *Journal of bacteriology* **181**: 3803-3809
- Asha PK, Blouin RT, Zaniewski R, Deutscher MP (1983) Ribonuclease BN: identification and partial characterization of a new tRNA processing enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**: 3301-3304
- Asha PK, Deutscher MP (1983) Escherichia coli CAN lacks a tRNA-processing nuclease. *Journal of bacteriology* **156**: 419-420
- Atkinson MR, Deutscher MP, Kornberg A, Russell AF, Moffatt JG (1969) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXIV. Termination of chain growth by a 2',3'-dideoxyribonucleotide. *Biochemistry* **8**: 4897-4904
- August JT, Ortiz PJ, Hurwitz J (1962) Ribonucleic acid-dependent ribonucleotide incorporation. I. Purification and properties of the enzyme. *The Journal of biological chemistry* **237**: 3786-3793
- Babitzke P, Granger L, Olszewski J, Kushner SR (1993) Analysis of mRNA decay and rRNA processing in Escherichia coli multiple mutants carrying a deletion in RNase III. *Journal of bacteriology* **175**: 229-239
- Babitzke P, Kushner SR (1991) The Ams (altered mRNA stability) protein and ribonuclease E are encoded by the same structural gene of Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 1-5
- Baga M, Goransson M, Normark S, Uhlin BE (1988) Processed mRNA with differential stability in the regulation of E. coli pilin gene expression. *Cell* **52**: 197-206
- Baginsky S, Shteiman-Kotler A, Liveanu V, Yehudai-Resheff S, Bellaoui M, Settlege RE, Shabanowitz J, Hunt DF, Schuster G, Gruissem W (2001) Chloroplast PNPase exists as a homo-multimer enzyme complex that is distinct from the Escherichia coli degradosome. *RNA (New York, NY)* **7**: 1464-1475
- Bai C, Tolias PP (1996) Cleavage of RNA hairpins mediated by a developmentally regulated CCCH zinc finger protein. *Molecular and cellular biology* **16**: 6661-6667
- Baker KE, Condon C (2004) Under the Tucson sun: a meeting in the desert on mRNA decay. *RNA (New York, NY)* **10**: 1680-1691
- Baker KE, Mackie GA (2003) Ectopic RNase E sites promote bypass of 5'-end-dependent mRNA decay in Escherichia coli. *Molecular microbiology* **47**: 75-88
- Ban N, Nissen P, Hansen J, Capel M, Moore PB, Steitz TA (1999) Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit. *Nature* **400**: 841-847
- Barciszewska MZ, Szymanski M, Erdmann VA, Barciszewski J (2001) Structure and functions of 5S rRNA. *Acta biochimica Polonica* **48**: 191-198
- Barlow T, Berkmen M, Georgellis D, Bayr L, Arvidson S, von Gabain A (1998) RNase E, the major player in mRNA degradation, is down-regulated in Escherichia coli during a transient growth retardation (diauxic lag). *Biological chemistry* **379**: 33-38
- Barron DJ, Schuster GS, Caughman GB, Lefebvre CA (1993) Biocompatibility of visible light-polymerized denture base resins. *The International journal of prosthodontics* **6**: 495-501
- Barry G, Squires C, Squires CL (1980) Attenuation and processing of RNA from the rplJL--rpoBC transcription unit of Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**: 3331-3335

- Bechhofer DH, Oussenko IA, Deikus G, Yao S, Mathy N, Condon C (2008) Analysis of mRNA decay in *Bacillus subtilis*. *Methods in enzymology* **447**: 259-276
- Beelman CA, Stevens A, Caponigro G, LaGrandeur TE, Hatfield L, Fortner DM, Parker R (1996) An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover. *Nature* **382**: 642-646
- Beguiristain N, Robertson HD, Gomez J (2005) RNase III cleavage demonstrates a long range RNA: RNA duplex element flanking the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Nucleic acids research* **33**: 5250-5261
- Beguiristain N, Robertson HD, Gomez J (2005) RNase III cleavage demonstrates a long range RNA: RNA duplex element flanking the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Nucleic acids research* **33**: 5250-5261
- Belasco JG, Higgins CF (1988) Mechanisms of mRNA decay in bacteria: a perspective. *Gene* **72**: 15-23
- Bernstein JA, Khodursky AB, Lin PH, Lin-Chao S, Cohen SN (2002) Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 9697-9702
- Bernstein JA, Lin PH, Cohen SN, Lin-Chao S (2004) Global analysis of *Escherichia coli* RNA degradosome function using DNA microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 2758-2763
- Bertrand E, Houser-Scott F, Kendall A, Singer RH, Engelke DR (1998) Nucleolar localization of early tRNA processing. *Genes & development* **12**: 2463-2468
- Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science (New York, NY)* **277**: 1453-1462
- Blouin RT, Zaniewski R, Deutscher MP (1983) Ribonuclease D is not essential for the normal growth of *Escherichia coli* or bacteriophage T4 or for the biosynthesis of a T4 suppressor tRNA. *The Journal of biological chemistry* **258**: 1423-1426
- Blum E, Carpousis AJ, Higgins CF (1999) Polyadenylation promotes degradation of 3'-structured RNA by the *Escherichia coli* mRNA degradosome in vitro. *The Journal of biological chemistry* **274**: 4009-4016
- Blum E, Py B, Carpousis AJ, Higgins CF (1997) Polyphosphate kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Molecular microbiology* **26**: 387-398
- Blundell M, Craig E, Kennell D (1972) Decay rates of different mRNA in *E. coli* and models of decay. *Nature: New biology* **238**: 46-49
- Bollenbach TJ, Schuster G, Stern DB (2004) Cooperation of endo- and exoribonucleases in chloroplast mRNA turnover. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **78**: 305-337
- Bouvet P, Belasco JG (1992) Control of RNase E-mediated RNA degradation by 5'-terminal base pairing in *E. coli*. *Nature* **360**: 488-491
- Bralley P, Jones GH (2001) Poly(A) polymerase activity and RNA polyadenylation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular microbiology* **40**: 1155-1164
- Bram RJ, Young RA, Steitz JA (1980) The ribonuclease III site flanking 23S sequences in the 30S ribosomal precursor RNA of *E. coli*. *Cell* **19**: 393-401
- Bramhill D (1997) Bacterial cell division. *Annual review of cell and developmental biology* **13**: 395-424
- Bramhill D, Thompson CM (1994) GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 5813-5817

- Brennan RG, Link TM (2007) Hfq structure, function and ligand binding. *Current opinion in microbiology* **10**: 125-133
- Brenner S. JFaMM (1961) An Unstable Intermediate Carrying Information from Genes to Ribosomes for Protein Synthesis. *Nature* **190**: 576 - 581
- Britton RA, Wen T, Schaefer L, Pellegrini O, Uicker WC, Mathy N, Tobin C, Daou R, Szyk J, Condon C (2007) Maturation of the 5' end of *Bacillus subtilis* 16S rRNA by the essential ribonuclease YkqC/RNase J1. *Molecular microbiology* **63**: 127-138
- Bronfenbrenner J (1927) Studies on the Bacteriophage of D'herelle : Vii. on the Particulate Nature of Bacteriophage. *The Journal of experimental medicine* **45**: 873-886
- Bronfenbrenner J, Muckenfuss R (1927) Studies on the Bacteriophage of D'herelle : Viii. the Mechanism of Lysis of Dead Bacteria in the Presence of Bacteriophage. *The Journal of experimental medicine* **45**: 887-909
- Bronfenbrenner J, Muckenfuss RS, Korb C (1926) Studies on the Bacteriophage of D'herelle : Vi. on the Virulence of the Overgrowth in the Lysed Cultures of *Bacillus Pestis Caviae* (M. T. li). *The Journal of experimental medicine* **44**: 607-622
- Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD, Noller HF (1981) Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* **148**: 107-127
- Buddelmeijer N, Beckwith J (2002) Assembly of cell division proteins at the *E. coli* cell center. *Current opinion in microbiology* **5**: 553-557
- Burgess RR, Travers AA, Dunn JJ, Bautz EK (1969) Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* **221**: 43-46
- Buts L, Lah J, Dao-Thi MH, Wyns L, Loris R (2005) Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. *Trends in biochemical sciences* **30**: 672-679
- Bycroft M, Hubbard TJ, Proctor M, Freund SM, Murzin AG (1997) The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell* **88**: 235-242
- Cairao F, Arraiano CM (2006) The role of endoribonucleases in the regulation of RNase R. *Biochemical and biophysical research communications* **343**: 731-737
- Cairao F, Chora A, Zilhao R, Carpousis AJ, Arraiano CM (2001) RNase II levels change according to the growth conditions: characterization of *gmr*, a new *Escherichia coli* gene involved in the modulation of RNase II. *Molecular microbiology* **39**: 1550-1561
- Callaghan AJ, Aurikko JP, Ilag LL, Gunter Grossmann J, Chandran V, Kuhnel K, Poljak L, Carpousis AJ, Robinson CV, Symmons MF, Luisi BF (2004) Studies of the RNA degradosome-organizing domain of the *Escherichia coli* ribonuclease RNase E. *Journal of molecular biology* **340**: 965-979
- Callaghan AJ, Grossmann JG, Redko YU, Ilag LL, Moncrieffe MC, Symmons MF, Robinson CV, McDowall KJ, Luisi BF (2003) Quaternary structure and catalytic activity of the *Escherichia coli* ribonuclease E amino-terminal catalytic domain. *Biochemistry* **42**: 13848-13855
- Callaghan AJ, Marcaida MJ, Stead JA, McDowall KJ, Scott WG, Luisi BF (2005) Structure of *Escherichia coli* RNase E catalytic domain and implications for RNA turnover. *Nature* **437**: 1187-1191
- Callaghan AJ, Redko Y, Murphy LM, Grossmann JG, Yates D, Garman E, Ilag LL, Robinson CV, Symmons MF, McDowall KJ, Luisi BF (2005) "Zn-link": a metal-sharing interface that organizes the quaternary structure and catalytic site of the endoribonuclease, RNase E. *Biochemistry* **44**: 4667-4675
- Callahan C, Deutscher MP (1996) Identification and characterization of the *Escherichia coli* *rnb* gene encoding the tRNA processing enzyme RNase BN. *Journal of bacteriology* **178**: 7329-7332

- Callahan C, Neri-Cortes D, Deutscher MP (2000) Purification and characterization of the tRNA-processing enzyme RNase BN. *The Journal of biological chemistry* **275**: 1030-1034
- Cam K, Rome G, Krisch HM, Bouche JP (1996) RNase E processing of essential cell division genes mRNA in Escherichia coli. *Nucleic acids research* **24**: 3065-3070
- Cao GJ, Sarkar N (1992) Identification of the gene for an Escherichia coli poly(A) polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 10380-10384
- Cao GJ, Sarkar N (1992) Poly(A) RNA in Escherichia coli: nucleotide sequence at the junction of the lpp transcript and the polyadenylate moiety. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 7546-7550
- Caponigro G, Parker R (1996) Mechanisms and control of mRNA turnover in Saccharomyces cerevisiae. *Microbiological reviews* **60**: 233-249
- Caponigro G, Parker R (1996) mRNA turnover in yeast promoted by the MATalpha1 instability element. *Nucleic acids research* **24**: 4304-4312
- Carpousis AJ (2002) The Escherichia coli RNA degradosome: structure, function and relationship in other ribonucleolytic multienzyme complexes. *Biochemical Society transactions* **30**: 150-155
- Carpousis AJ (2003) Degradation of targeted mRNAs in Escherichia coli: regulation by a small antisense RNA. *Genes & development* **17**: 2351-2355
- Carpousis AJ (2007) The RNA degradosome of Escherichia coli: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annual review of microbiology* **61**: 71-87
- Carpousis AJ, Khemici V, Ait-Bara S, Poljak L (2008) Co-immunopurification of multiprotein complexes containing RNA-degrading enzymes. *Methods in enzymology* **447**: 65-82
- Carpousis AJ, Khemici V, Poljak L (2008) Assaying DEAD-box RNA helicases and their role in mRNA degradation in Escherichia coli. *Methods in enzymology* **447**: 183-197
- Carpousis AJ, Leroy A, Vanzo N, Khemici V (2001) Escherichia coli RNA degradosome. *Methods in enzymology* **342**: 333-345
- Carpousis AJ, Luisi BF, McDowall KJ (2009) Chapter 3 Endonucleolytic Initiation of mRNA Decay in Escherichia coli. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **85**: 91-135
- Carpousis AJ, Van Houwe G, Ehretsmann C, Krisch HM (1994) Copurification of E. coli RNAase E and PNPase: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell* **76**: 889-900
- Carpousis AJ, Vanzo NF, Raynal LC (1999) mRNA degradation. A tale of poly(A) and multiprotein machines. *Trends Genet* **15**: 24-28
- Caruthers JM, Feng Y, McKay DB, Cohen SN (2006) Retention of core catalytic functions by a conserved minimal ribonuclease E peptide that lacks the domain required for tetramer formation. *The Journal of biological chemistry* **281**: 27046-27051
- Casaregola S, Jacq A, Laoudj D, McGurk G, Margaron S, Tempete M, Norris V, Holland IB (1992) Cloning and analysis of the entire Escherichia coli ams gene. ams is identical to hmp1 and encodes a 114 kDa protein that migrates as a 180 kDa protein. *Journal of molecular biology* **228**: 30-40
- Casaregola S, Jacq A, Laoudj D, McGurk G, Margaron S, Tempete M, Norris V, Holland IB (1994) Cloning and analysis of the entire Escherichia coli ams gene. ams is identical to hmp1 and encodes a 114 kDa protein that migrates as a 180 kDa protein. *Journal of molecular biology* **238**: 867
- Casaregola S, Khidhir M, Holland IB (1987) Effects of modulation of RNase H production on the recovery of DNA synthesis following UV-irradiation in Escherichia coli. *Mol Gen Genet* **209**: 494-498

Case LM, Chen XN, Deutscher MP (1989) Localization of the Escherichia coli rnt gene encoding RNase T by using a combination of physical and genetic mapping. *Journal of bacteriology* **171**: 5736-5737

Caughman WF, Caughman GB, Dominy WT, Schuster GS (1990) Glass ionomer and composite resin cements: effects on oral cells. *The Journal of prosthetic dentistry* **63**: 513-521

Celesnik H, Deana A, Belasco JG (2007) Initiation of RNA decay in Escherichia coli by 5' pyrophosphate removal. *Molecular cell* **27**: 79-90

Chandran V, Luisi BF (2006) Recognition of enolase in the Escherichia coli RNA degradosome. *Journal of molecular biology* **358**: 8-15

Chandran V, Poljak L, Vanzo NF, Leroy A, Miguel RN, Fernandez-Recio J, Parkinson J, Burns C, Carpousis AJ, Luisi BF (2007) Recognition and cooperation between the ATP-dependent RNA helicase RhlB and ribonuclease RNase E. *Journal of molecular biology* **367**: 113-132

Chang AC, Israel A, Gazdar A, Cohen SN (1989) Initiation of pro-opiomelanocortin mRNA from a normally quiescent promoter in a human small cell lung cancer cell line. *Gene* **84**: 115-126

Chang AC, Sohlberg B, Trinkle-Mulcahy L, Claverie-Martin F, Cohen P, Cohen SN (1999) Alternative splicing regulates the production of ARD-1 endoribonuclease and NIPP-1, an inhibitor of protein phosphatase-1, as isoforms encoded by the same gene. *Gene* **240**: 45-55

Chang SA, Cozad M, Mackie GA, Jones GH (2008) Kinetics of polynucleotide phosphorylase: comparison of enzymes from Streptomyces and Escherichia coli and effects of nucleoside diphosphates. *Journal of bacteriology* **190**: 98-106

Chauhan AK, Apirion D (1991) The rne gene is the structural gene for the processing endoribonuclease RNase E of Escherichia coli. *Mol Gen Genet* **228**: 49-54

Chauhan AK, Miczak A, Taraseviciene L, Apirion D (1991) Sequencing and expression of the rne gene of Escherichia coli. *Nucleic acids research* **19**: 125-129

Chauhan AK, Miczak A, Taraseviciene L, Apirion D (1991) Sequencing and expression of the rne gene of Escherichia coli. *Nucleic acids research* **19**: 125-129

Chebloune Y, Trabuchet G, Poncet D, Cohen-Solal M, Faure C, Verdier G, Nigon VM (1984) A new method for detection of small modifications in genomic DNA, applied to the human delta-beta globin gene cluster. *European journal of biochemistry / FEBS* **142**: 473-480

Chen C, Deutscher MP (2005) Elevation of RNase R in response to multiple stress conditions. *The Journal of biological chemistry* **280**: 34393-34396

Chen JY, Martin NC (1988) Biosynthesis of tRNA in yeast mitochondria. An endonuclease is responsible for the 3'-processing of tRNA precursors. *The Journal of biological chemistry* **263**: 13677-13682

Chen LH, Emory SA, Bricker AL, Bouvet P, Belasco JG (1991) Structure and function of a bacterial mRNA stabilizer: analysis of the 5' untranslated region of ompA mRNA. *Journal of bacteriology* **173**: 4578-4586

Cheng ZF, Deutscher MP (2002) Purification and characterization of the Escherichia coli exoribonuclease RNase R. Comparison with RNase II. *The Journal of biological chemistry* **277**: 21624-21629

Cheng ZF, Deutscher MP (2003) Quality control of ribosomal RNA mediated by polynucleotide phosphorylase and RNase R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 6388-6393

Cheng ZF, Deutscher MP (2005) An important role for RNase R in mRNA decay. *Molecular cell* **17**: 313-318

- Cheng ZF, Zuo Y, Li Z, Rudd KE, Deutscher MP (1998) The vacB gene required for virulence in *Shigella flexneri* and *Escherichia coli* encodes the exoribonuclease RNase R. *The Journal of biological chemistry* **273**: 14077-14080
- Ciechanover A (1994) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* **79**: 13-21
- Citovsky V, Knorr D, Schuster G, Zambryski P (1990) The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-strand nucleic acid binding protein. *Cell* **60**: 637-647
- Claverie-Martin F, Diaz-Torres MR, Yancey SD, Kushner SR (1989) Cloning of the altered mRNA stability (ams) gene of *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* **171**: 5479-5486
- Claverie-Martin F, Diaz-Torres MR, Yancey SD, Kushner SR (1991) Analysis of the altered mRNA stability (ams) gene from *Escherichia coli*. Nucleotide sequence, transcriptional analysis, and homology of its product to MRP3, a mitochondrial ribosomal protein from *Neurospora crassa*. *The Journal of biological chemistry* **266**: 2843-2851
- Claverie-Martin F, Wang M, Cohen SN (1997) ARD-1 cDNA from human cells encodes a site-specific single-strand endoribonuclease that functionally resembles *Escherichia coli* RNase E. *The Journal of biological chemistry* **272**: 13823-13828
- Coburn GA, Mackie GA (1996) Differential sensitivities of portions of the mRNA for ribosomal protein S20 to 3'-exonucleases dependent on oligoadenylation and RNA secondary structure. *The Journal of biological chemistry* **271**: 15776-15781
- Coburn GA, Mackie GA (1996) Overexpression, purification, and properties of *Escherichia coli* ribonuclease II. *The Journal of biological chemistry* **271**: 1048-1053
- Coburn GA, Mackie GA (1998) Reconstitution of the degradation of the mRNA for ribosomal protein S20 with purified enzymes. *Journal of molecular biology* **279**: 1061-1074
- Coburn GA, Mackie GA (1999) Degradation of mRNA in *Escherichia coli*: an old problem with some new twists. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **62**: 55-108
- Coburn GA, Miao X, Briant DJ, Mackie GA (1999) Reconstitution of a minimal RNA degradosome demonstrates functional coordination between a 3' exonuclease and a DEAD-box RNA helicase. *Genes & development* **13**: 2594-2603
- Cohen S, Mechali M (2001) A novel cell-free system reveals a mechanism of circular DNA formation from tandem repeats. *Nucleic acids research* **29**: 2542-2548
- Cohen SA, Benedek K, Tapuhi Y, Ford JC, Karger BL (1985) Conformational effects in the reversed-phase liquid chromatography of ribonuclease A. *Analytical biochemistry* **144**: 275-284
- Cohen SG (1985) Immunologic aspects of eosinophilia. *New England and regional allergy proceedings* **6**: 352-359
- Cohen SG, Sapp TM (1967) Experimental eosinophilia X. Relation of antigen-antibody complex size and protein molecular weight to cell responses. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* **124**: 1034-1038
- Cohen SM, Brennecke J (2006) Developmental biology. Mixed messages in early development. *Science (New York, NY)* **312**: 65-66
- Cohen SN (1995) Surprises at the 3' end of prokaryotic RNA. *Cell* **80**: 829-832
- Cohen SN, McDowall KJ (1997) RNase E: still a wonderfully mysterious enzyme. *Molecular microbiology* **23**: 1099-1106
- Cohen SN, McDowall KJ (1997) RNase E: still a wonderfully mysterious enzyme. *Molecular microbiology* **23**: 1099-1106
- Cohen-Solal K, Vitrat N, Titeux M, Vainchenker W, Wendling F (1999) High-level expression of Mpl in platelets and megakaryocytes is independent of thrombopoietin. *Blood* **93**: 2859-2866

- Cohen-Solal M, Forget BG, Prensky W, Marotta CA, Weissman SM (1977) Human beta-globin messenger RNA. II. nucleotide sequences derived from 125I-labeled globin messenger RNA. *The Journal of biological chemistry* **252**: 5032-5039
- Condon C (2003) RNA processing and degradation in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 157-174, table of contents
- Condon C (2006) Shutdown decay of mRNA. *Molecular microbiology* **61**: 573-583
- Condon C (2007) Maturation and degradation of RNA in bacteria. *Current opinion in microbiology* **10**: 271-278
- Condon C, Brechemier-Baey D, Beltchev B, Grunberg-Manago M, Putzer H (2001) Identification of the gene encoding the 5S ribosomal RNA maturase in *Bacillus subtilis*: mature 5S rRNA is dispensable for ribosome function. *RNA (New York, NY)* **7**: 242-253
- Condon C, French S, Squires C, Squires CL (1993) Depletion of functional ribosomal RNA operons in *Escherichia coli* causes increased expression of the remaining intact copies. *The EMBO journal* **12**: 4305-4315
- Condon C, Grunberg-Manago M, Putzer H (1996) Aminoacyl-tRNA synthetase gene regulation in *Bacillus subtilis*. *Biochimie* **78**: 381-389
- Condon C, Liveris D, Squires C, Schwartz I, Squires CL (1995) rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of *rrn* inactivation. *Journal of bacteriology* **177**: 4152-4156
- Condon C, Pellegrini O, Mathy N, Benard L, Redko Y, Oussenko IA, Deikus G, Bechhofer DH (2008) Assay of *Bacillus subtilis* ribonucleases in vitro. *Methods in enzymology* **447**: 277-308
- Condon C, Philips J, Fu ZY, Squires C, Squires CL (1992) Comparison of the expression of the seven ribosomal RNA operons in *Escherichia coli*. *The EMBO journal* **11**: 4175-4185
- Condon C, Putzer H, Grunberg-Manago M (1996) Processing of the leader mRNA plays a major role in the induction of *thrS* expression following threonine starvation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 6992-6997
- Condon C, Putzer H, Luo D, Grunberg-Manago M (1997) Processing of the *Bacillus subtilis* *thrS* leader mRNA is RNase E-dependent in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* **268**: 235-242
- Condon C, Rourera J, Brechemier-Baey D, Putzer H (2002) Ribonuclease M5 has few, if any, mRNA substrates in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **184**: 2845-2849
- Condon C, Squires C, Squires CL (1995) Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews* **59**: 623-645
- Cordis GA, Goldblatt PJ, Deutscher MP (1975) Purification and characterization of a major endonuclease from rat liver nuclei. *Biochemistry* **14**: 2596-2603
- Cormack RS, Genereaux JL, Mackie GA (1993) RNase E activity is conferred by a single polypeptide: overexpression, purification, and properties of the *ams/rne/hmp1* gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 9006-9010
- Cormack RS, Mackie GA (1992) Structural requirements for the processing of *Escherichia coli* 5 S ribosomal RNA by RNase E in vitro. *Journal of molecular biology* **228**: 1078-1090
- Corpet F, Gouzy J, Kahn D (1998) The ProDom database of protein domain families. *Nucleic acids research* **26**: 323-326
- Craven MG, Henner DJ, Alessi D, Schauer AT, Ost KA, Deutscher MP, Friedman DI (1992) Identification of the *rph* (RNase PH) gene of *Bacillus subtilis*: evidence for suppression of cold-sensitive mutations in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **174**: 4727-4735
- Csanadi A, Faludi I, Miczak A (2009) MSMEG_4626 ribonuclease from *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular biology reports*

- Cudny H, Deutscher MP (1980) Apparent involvement of ribonuclease D in the 3' processing of tRNA precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**: 837-841
- Cudny H, Deutscher MP (1986) High-level overexpression, rapid purification, and properties of Escherichia coli tRNA nucleotidyltransferase. *The Journal of biological chemistry* **261**: 6450-6453
- Cudny H, Deutscher MP (1988) 3' processing of tRNA precursors in ribonuclease-deficient Escherichia coli. Development and characterization of an in vitro processing system and evidence for a phosphate requirement. *The Journal of biological chemistry* **263**: 1518-1523
- Cudny H, Roy P, Deutscher MP (1981) Alteration of Escherichia coli RNase D by infection with bacteriophage T4. *Biochemical and biophysical research communications* **98**: 337-345
- Cudny H, Zaniewski R, Deutscher MP (1981) Escherichia coli RNase D. Catalytic properties and substrate specificity. *The Journal of biological chemistry* **256**: 5633-5637
- Cudny H, Zaniewski R, Deutscher MP (1981) Escherichia coli RNase D. Purification and structural characterization of a putative processing nuclease. *The Journal of biological chemistry* **256**: 5627-5632
- Dai K, Lutkenhaus J (1991) ftsZ is an essential cell division gene in Escherichia coli. *Journal of bacteriology* **173**: 3500-3506
- Dai K, Lutkenhaus J (1992) The proper ratio of FtsZ to FtsA is required for cell division to occur in Escherichia coli. *Journal of bacteriology* **174**: 6145-6151
- Dallmann G, Quinn T, Apirion D (1983) A gene affecting accumulation of the RNA moiety of the processing enzyme RNase P. *Journal of bacteriology* **156**: 529-536
- Daou-Chabo R, Condon C (2009) RNase J1 endonuclease activity as a probe of RNA secondary structure. *RNA (New York, NY)* **15**: 1417-1425
- Daou-Chabo R, Mathy N, Benard L, Condon C (2009) Ribosomes initiating translation of the hbs mRNA protect it from 5'-to-3' exoribonucleolytic degradation by RNase J1. *Molecular microbiology* **71**: 1538-1550
- de Boer P, Crossley R, Rothfield L (1992) The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature* **359**: 254-256
- Deana A, Belasco JG (2004) The function of RNase G in Escherichia coli is constrained by its amino and carboxyl termini. *Molecular microbiology* **51**: 1205-1217
- Deana A, Celesnik H, Belasco JG (2008) The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal. *Nature* **451**: 355-358
- Deikus G, Condon C, Bechhofer DH (2008) Role of Bacillus subtilis RNase J1 endonuclease and 5'-exonuclease activities in trp leader RNA turnover. *The Journal of biological chemistry* **283**: 17158-17167
- Deutscher M (1990) Ribonucleases. Introduction. *Biochimie* **72**: 769
- Deutscher MP (1985) E. coli RNases: making sense of alphabet soup. *Cell* **40**: 731-732
- Deutscher MP (1988) The metabolic role of RNases. *Trends in biochemical sciences* **13**: 136-139
- Deutscher MP (1990) Ribonucleases active at 3' terminus of transfer RNA. *Methods in enzymology* **181**: 421-433
- Deutscher MP (1990) Ribonucleases, tRNA nucleotidyltransferase, and the 3' processing of tRNA. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **39**: 209-240
- Deutscher MP (1993) Promiscuous exoribonucleases of Escherichia coli. *Journal of bacteriology* **175**: 4577-4583

- Deutscher MP (1993) Ribonuclease multiplicity, diversity, and complexity. *The Journal of biological chemistry* **268**: 13011-13014
- Deutscher MP (2003) Degradation of stable RNA in bacteria. *The Journal of biological chemistry* **278**: 45041-45044
- Deutscher MP (2006) Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic acids research* **34**: 659-666
- Deutscher MP (2009) Chapter 9 maturation and degradation of ribosomal RNA in bacteria. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **85**: 369-391
- Deutscher MP, Chambon P, Konberg A (1968) Biochemical studies of bacterial sporulation and germination. XI. Protein-synthesizing systems from vegetative cells and spores of *Bacillus megaterium*. *The Journal of biological chemistry* **243**: 5117-5125
- Deutscher MP, Li Z (2001) Exoribonucleases and their multiple roles in RNA metabolism. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **66**: 67-105
- Deutscher MP, Marlor CW (1985) Purification and characterization of *Escherichia coli* RNase T. *The Journal of biological chemistry* **260**: 7067-7071
- Deutscher MP, Marlor CW, Zaniewski R (1984) Ribonuclease T: new exoribonuclease possibly involved in end-turnover of tRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**: 4290-4293
- Deutscher MP, Marlor CW, Zaniewski R (1985) RNase T is responsible for the end-turnover of tRNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 6427-6430
- Deutscher MP, Marshall GT, Cudny H (1988) RNase PH: an *Escherichia coli* phosphate-dependent nuclease distinct from polynucleotide phosphorylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 4710-4714
- Deutscher MP, Reuven NB (1991) Enzymatic basis for hydrolytic versus phosphorolytic mRNA degradation in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 3277-3280
- Dewar SJ, Begg KJ, Donachie WD (1992) Inhibition of cell division initiation by an imbalance in the ratio of FtsA to FtsZ. *Journal of bacteriology* **174**: 6314-6316
- Dewar SJ, Donachie WD (1993) Antisense transcription of the *ftsZ-ftsA* gene junction inhibits cell division in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **175**: 7097-7101
- Dewar SJ, Dorazi R (2000) Control of division gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters* **187**: 1-7
- Dickson E, Pape LK, Robertson HD (1979) Approaches to sequence analysis of 125I-labeled RNA. *Nucleic acids research* **6**: 91-110
- Diwa A, Bricker AL, Jain C, Belasco JG (2000) An evolutionarily conserved RNA stem-loop functions as a sensor that directs feedback regulation of RNase E gene expression. *Genes & development* **14**: 1249-1260
- Diwa AA, Belasco JG (2002) Critical features of a conserved RNA stem-loop important for feedback regulation of RNase E synthesis. *The Journal of biological chemistry* **277**: 20415-20422
- Diwa AA, Jiang X, Schapira M, Belasco JG (2002) Two distinct regions on the surface of an RNA-binding domain are crucial for RNase E function. *Molecular microbiology* **46**: 959-969
- Donovan WP, Kushner SR (1983) Amplification of ribonuclease II (*rnb*) activity in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic acids research* **11**: 265-275
- Donovan WP, Kushner SR (1986) Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in *Escherichia coli* K-12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 120-124

- Dreyfus M (2009) Chapter 11 killer and protective ribosomes. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **85**: 423-466
- Dreyfus M, Regnier P (2002) The poly(A) tail of mRNAs: bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria. *Cell* **111**: 611-613
- Drider D, Condon C (2004) The continuing story of endoribonuclease III. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **8**: 195-200
- Dubrovsky EB, Dubrovskaya VA, Levinger L, Schiffer S, Marchfelder A (2004) Drosophila RNase Z processes mitochondrial and nuclear pre-tRNA 3' ends in vivo. *Nucleic acids research* **32**: 255-262
- Dunn JJ (1976) RNase III cleavage of single-stranded RNA. Effect of ionic strength on the fidelity of cleavage. *The Journal of biological chemistry* **251**: 3807-3814
- Dunn JJ, Studier FW (1973) T7 early RNAs and Escherichia coli ribosomal RNAs are cut from large precursor RNAs in vivo by ribonuclease 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**: 3296-3300
- Dunn JJ, Studier FW (1980) The transcription termination site at the end of the early region of bacteriophage T7 DNA. *Nucleic acids research* **8**: 2119-2132
- Edwards TE, Klein DJ, Ferre-D'Amare AR (2007) Riboswitches: small-molecule recognition by gene regulatory RNAs. *Current opinion in structural biology* **17**: 273-279
- Egea PF, Stroud RM, Walter P (2005) Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Current opinion in structural biology* **15**: 213-220
- Ehretsmann CP, Carpousis AJ, Krisch HM (1992) mRNA degradation in procaryotes. *Faseb J* **6**: 3186-3192
- Ehretsmann CP, Carpousis AJ, Krisch HM (1992) Specificity of Escherichia coli endoribonuclease RNase E: in vivo and in vitro analysis of mutants in a bacteriophage T4 mRNA processing site. *Genes & development* **6**: 149-159
- Emory SA, Bouvet P, Belasco JG (1992) A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in Escherichia coli. *Genes & development* **6**: 135-148
- Ezraty B, Dahlgren B, Deutscher MP (2005) The RNase Z homologue encoded by Escherichia coli elaC gene is RNase BN. *The Journal of biological chemistry* **280**: 16542-16545
- Fang M, Zeisberg WM, Condon C, Ogryzko V, Danchin A, Mechold U (2009) Degradation of nanoRNA is performed by multiple redundant RNases in Bacillus subtilis. *Nucleic acids research* **37**: 5114-5125
- Faubladier M, Cam K, Bouche JP (1990) Escherichia coli cell division inhibitor DicF-RNA of the dicB operon. Evidence for its generation in vivo by transcription termination and by RNase III and RNase E-dependent processing. *Journal of molecular biology* **212**: 461-471
- Feng Y, Huang H, Liao J, Cohen SN (2001) Escherichia coli poly(A)-binding proteins that interact with components of degradosomes or impede RNA decay mediated by polynucleotide phosphorylase and RNase E. *The Journal of biological chemistry* **276**: 31651-31656
- Feng Y, Vickers TA, Cohen SN (2002) The catalytic domain of RNase E shows inherent 3' to 5' directionality in cleavage site selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 14746-14751
- Fernandez-Saiz M, Henderson PT, Wilson WD, Schuster GB (1999) Selective photocleavage of DNA and RNA by anthraquinone derivatives: targeting the single-strand region of hairpin structures. *Photochemistry and photobiology* **70**: 847-852
- Finn RD, Tate J, Mistry J, Coghill PC, Sammut SJ, Hotz HR, Ceric G, Forslund K, Eddy SR, Sonnhammer EL, Bateman A (2008) The Pfam protein families database. *Nucleic acids research* **36**: D281-288

- Flardh K, Palacios P, Vicente M (1998) Cell division genes ftsQAZ in Escherichia coli require distant cis-acting signals upstream of ddIB for full expression. *Molecular microbiology* **30**: 305-315
- Folichon M, Arluisson V, Pellegrini O, Huntzinger E, Regnier P, Haindorf E (2003) The poly(A) binding protein Hfq protects RNA from RNase E and exoribonucleolytic degradation. *Nucleic acids research* **31**: 7302-7310
- Forget BG, Weissman SM (1967) Nucleotide sequence of KB cell 5S RNA. *Science (New York, NY)* **158**: 1695-1699
- Fox GE, Woese CR (1975) The architecture of 5S rRNA and its relation to function. *Journal of molecular evolution* **6**: 61-76
- Franze de Fernandez MT, Eoyang L, August JT (1968) Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA. *Nature* **219**: 588-590
- Frey G, Thomm M, Brudigam B, Gohl HP, Hausner W (1990) An archaeobacterial cell-free transcription system. The expression of tRNA genes from Methanococcus vannielii is mediated by a transcription factor. *Nucleic acids research* **18**: 1361-1367
- Gama-Castro S, Jimenez-Jacinto V, Peralta-Gil M, Santos-Zavaleta A, Penaloza-Spinola MI, Contreras-Moreira B, Segura-Salazar J, Muniz-Rascado L, Martinez-Flores I, Salgado H, Bonavides-Martinez C, Abreu-Goodger C, Rodriguez-Penagos C, Miranda-Rios J, Morett E, Merino E, Huerta AM, Trevino-Quintanilla L, Collado-Vides J (2008) RegulonDB (version 6.0): gene regulation model of Escherichia coli K-12 beyond transcription, active (experimental) annotated promoters and Textpresso navigation. *Nucleic acids research* **36**: D120-124
- Gao J, Lee K, Zhao M, Qiu J, Zhan X, Saxena A, Moore CJ, Cohen SN, Georgiou G (2006) Differential modulation of E. coli mRNA abundance by inhibitory proteins that alter the composition of the degradosome. *Molecular microbiology* **61**: 394-406
- Garrett R (1999) Mechanics of the ribosome. *Nature* **400**: 811-812
- Ge H, Zuo P, Manley JL (1991) Primary structure of the human splicing factor ASF reveals similarities with Drosophila regulators. *Cell* **66**: 373-382
- Gegenheimer P, Apirion D (1978) Processing of rRNA by RNAase P: spacer tRNAs are linked to 16S rRNA in an RNAase P RNAase III mutant strain of E. coli. *Cell* **15**: 527-539
- Gegenheimer P, Apirion D (1980) Precursors to 16S and 23S ribosomal RNA from a ribonuclear III-strain of Escherichia coli contain intact RNase III processing sites. *Nucleic acids research* **8**: 1873-1891
- Gegenheimer P, Apirion D (1980) Structural characterization and in vitro processing of Escherichia coli ribosomal RNA transcripts containing 5'- triphosphates, leader sequences, 16 S rRNA, and spacer tRNAs. *Journal of molecular biology* **143**: 227-257
- Gegenheimer P, Apirion D (1981) Processing of procaryotic ribonucleic acid. *Microbiological reviews* **45**: 502-541
- Geisser M, Mackie GA (1976) The binding site of Escherichia coli ribosomal protein S4 on 16-S ribosomal RNA from different bacterial species. *European journal of biochemistry / FEBS* **70**: 159-170
- Gerdes K, Christensen SK, Lobner-Olesen A (2005) Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nature reviews* **3**: 371-382
- Gholamhoseinian A, Shen Z, Wu JJ, Piggot P (1992) Regulation of transcription of the cell division gene ftsA during sporulation of Bacillus subtilis. *Journal of bacteriology* **174**: 4647-4656
- Ghora BK, Apirion D (1978) Structural analysis and in vitro processing to p5 rRNA of a 9S RNA molecule isolated from an rne mutant of E. coli. *Cell* **15**: 1055-1066
- Ghora BK, Apirion D (1979) 5S ribosomal RNA is contained within a 25 S ribosomal RNA that accumulates in mutants of Escherichia coli defective in processing of ribosomal RNA. *Journal of molecular biology* **127**: 507-513

- Ghora BK, Apirion D (1979) Identification of a novel RNA molecule in a new RNA processing mutant of Escherichia coli which contains 5 S rRNA sequences. *The Journal of biological chemistry* **254**: 1951-1956
- Ghora BK, Apirion D (1979) Identification of a novel RNA molecule in a new RNA processing mutant of Escherichia coli which contains 5 S rRNA sequences. *The Journal of biological chemistry* **254**: 1951-1956
- Ghosh RK, Deutscher MP (1978) Identification of an Escherichia coli nuclease acting on structurally altered transfer RNA molecules. *The Journal of biological chemistry* **253**: 997-1000
- Ghosh RK, Deutscher MP (1978) Purification of potential 3' processing nucleases using synthetic tRNA precursors. *Nucleic acids research* **5**: 3831-3842
- Ghosh S, Deutscher MP (1999) Oligoribonuclease is an essential component of the mRNA decay pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 4372-4377
- Gitelman DR, Apirion D (1980) The synthesis of some proteins is affected in RNA processing mutants of Escherichia coli. *Biochemical and biophysical research communications* **96**: 1063-1070
- Goehring NW, Beckwith J (2005) Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr Biol* **15**: R514-526
- Goldblum K, Apirion D (1981) Inactivation of the ribonucleic acid-processing enzyme ribonuclease E blocks cell division. *Journal of bacteriology* **146**: 128-132
- Golovkin M, Reddy AS (1996) Structure and expression of a plant U1 snRNP 70K gene: alternative splicing of U1 snRNP 70K pre-mRNAs produces two different transcripts. *The Plant cell* **8**: 1421-1435
- Gonzalez Porque P, Baldesten A, Reichard P (1970) The involvement of the thioredoxin system in the reduction of methionine sulfoxide and sulfate. *The Journal of biological chemistry* **245**: 2371-2374
- Gopalakrishna Y, Langley D, Sarkar N (1981) Detection of high levels of polyadenylate-containing RNA in bacteria by the use of a single-step RNA isolation procedure. *Nucleic acids research* **9**: 3545-3554
- Gottesman S (2004) The small RNA regulators of Escherichia coli: roles and mechanisms*. *Annual review of microbiology* **58**: 303-328
- Gottesman S (2004) Small RNAs shed some light. *Cell* **118**: 1-2
- Gottesman S, McCullen CA, Guillier M, Vanderpool CK, Majdalani N, Benhammou J, Thompson KM, FitzGerald PC, Sowa NA, FitzGerald DJ (2006) Small RNA regulators and the bacterial response to stress. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **71**: 1-11
- Granger LL, O'Hara EB, Wang RF, Meffen FV, Armstrong K, Yancey SD, Babitzke P, Kushner SR (1998) The Escherichia coli mrsC gene is required for cell growth and mRNA decay. *Journal of bacteriology* **180**: 1920-1928
- Griffin BE (1971) Separation of 32P-labelled ribonucleic acid components. The use of polyethylenimine-cellulose (TLC) as a second dimension in separating oligoribonucleotides of '4.5 S' and 5 S from E. coli. *FEBS letters* **15**: 165-168
- Gros F, Hiatt H, Gilbert W, Kurland CG, Risebrough RW, Watson JD (1961) Unstable ribonucleic acid revealed by pulse labelling of Escherichia coli. *Nature* **190**: 581-585
- Guerrier-Takada C, Li Y, Altman S (1995) Artificial regulation of gene expression in Escherichia coli by RNase P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 11115-11119
- Guiso N, Dreyfus M, Siffert O, Danchin A, Spyridakis A, Gargouri A, Claisse M, Slonimski PP (1984) Antibodies against synthetic oligopeptides allow identification of the mRNA-maturase encoded by the second intron of the yeast cob-box gene. *The EMBO journal* **3**: 1769-1772

- Gurevitz M, Apirion D (1983) Interplay among processing and degradative enzymes and a precursor ribonucleic acid in the selective maturation and maintenance of ribonucleic acid molecules. *Biochemistry* **22**: 4000-4005
- Gurevitz M, Apirion D (1983) Processing of bacteriophage T4 tRNAs: a precursor of species 1 RNA. *FEBS letters* **159**: 180-184
- Gurevitz M, Apirion D (1985) The ribonuclease-III-processing site near the 5' end of an RNA precursor of bacteriophage T4 and its effect on termination. *European journal of biochemistry / FEBS* **147**: 581-586
- Gurevitz M, Jain SK, Apirion D (1983) Identification of a precursor molecular for the RNA moiety of the processing enzyme RNase P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**: 4450-4454
- Gurevitz M, Watson N, Apirion D (1982) A cleavage site of ribonuclease F. A putative processing endoribonuclease from *Escherichia coli*. *European journal of biochemistry / FEBS* **124**: 553-559
- Hacham Y, Schuster G, Amir R (2006) An in vivo internal deletion in the N-terminus region of Arabidopsis cystathionine gamma-synthase results in CGS expression that is insensitive to methionine. *Plant J* **45**: 955-967
- Hacham Y, Song L, Schuster G, Amir R (2007) Lysine enhances methionine content by modulating the expression of S-adenosylmethionine synthase. *Plant J* **51**: 850-861
- Hacker J, Blum-Oehler G, Muhldorfer I, Tschape H (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular microbiology* **23**: 1089-1097
- Hagege JM, Cohen SN (1997) A developmentally regulated *Streptomyces* endoribonuclease resembles ribonuclease E of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **25**: 1077-1090
- Hajnsdorf E, Braun F, Haugel-Nielsen J, Le Derout J, Regnier P (1996) Multiple degradation pathways of the rpsO mRNA of *Escherichia coli*. RNase E interacts with the 5' and 3' extremities of the primary transcript. *Biochimie* **78**: 416-424
- Hajnsdorf E, Braun F, Haugel-Nielsen J, Regnier P (1995) Polyadenylation destabilizes the rpsO mRNA of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 3973-3977
- Hajnsdorf E, Carpousis AJ, Regnier P (1994) Nucleolytic inactivation and degradation of the RNase III processed pnp message encoding polynucleotide phosphorylase of *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* **239**: 439-454
- Hajnsdorf E, Regnier P (2000) Host factor Hfq of *Escherichia coli* stimulates elongation of poly(A) tails by poly(A) polymerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 1501-1505
- Hajnsdorf E, Steier O, Coscoy L, Teyssset L, Regnier P (1994) Roles of RNase E, RNase II and PNPase in the degradation of the rpsO transcripts of *Escherichia coli*: stabilizing function of RNase II and evidence for efficient degradation in an *ams pnp rnb* mutant. *The EMBO journal* **13**: 3368-3377
- Halic M, Beckmann R (2005) The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Current opinion in structural biology* **15**: 116-125
- Hamilton CM, Aldea M, Washburn BK, Babitzke P, Kushner SR (1989) New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **171**: 4617-4622
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**: 557-580
- Hankins JS, Zappavigna C, Prud'homme-Genereux A, Mackie GA (2007) Role of RNA structure and susceptibility to RNase E in regulation of a cold shock mRNA, *cspA* mRNA. *Journal of bacteriology* **189**: 4353-4358
- Hansen MJ, Chen LH, Fejzo ML, Belasco JG (1994) The *ompA* 5' untranslated region impedes a major pathway for mRNA degradation in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **12**: 707-716

Harris TJ, Dunn JJ, Wimmer E (1978) Identification of specific fragments containing the 5' end of poliovirus RNA after ribonuclease III digestion. *Nucleic acids research* **5**: 4039-4054

Haugel-Nielsen J, Hajnsdorf E, Regnier P (1996) The rpsO mRNA of Escherichia coli is polyadenylated at multiple sites resulting from endonucleolytic processing and exonucleolytic degradation. *The EMBO journal* **15**: 3144-3152

Hautala JA, Bassett CL, Giles NH, Kushner SR (1979) Increased expression of a eukaryotic gene in Escherichia coli through stabilization of its messenger RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 5774-5778

Hayes R, Kudla J, Schuster G, Gabay L, Maliga P, Griesem W (1996) Chloroplast mRNA 3'-end processing by a high molecular weight protein complex is regulated by nuclear encoded RNA binding proteins. *The EMBO journal* **15**: 1132-1141

He F, Jacobson A (1995) Identification of a novel component of the nonsense-mediated mRNA decay pathway by use of an interacting protein screen. *Genes & development* **9**: 437-454

He L, Soderbom F, Wagner EG, Binnie U, Binns N, Masters M (1993) PcnB is required for the rapid degradation of RNAI, the antisense RNA that controls the copy number of ColE1-related plasmids. *Molecular microbiology* **9**: 1131-1142

Heinrich T, Condon C, Pfeiffer T, Hartmann RK (1995) Point mutations in the leader boxA of a plasmid-encoded Escherichia coli rrnB operon cause defective antitermination in vivo. *Journal of bacteriology* **177**: 3793-3800

Helmann JD, Chamberlin MJ (1988) Structure and function of bacterial sigma factors. *Annual review of biochemistry* **57**: 839-872

Henkin TM (2008) Riboswitch RNAs: using RNA to sense cellular metabolism. *Genes & development* **22**: 3383-3390

Henry MD, Yancey SD, Kushner SR (1992) Role of the heat shock response in stability of mRNA in Escherichia coli K-12. *Journal of bacteriology* **174**: 743-748

Hentze MW, Kulozik AE (1999) A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* **96**: 307-310

Herr W, Noller HF (1975) A fragment of 23S RNA containing a nucleotide sequence complementary to a region of 5S RNA. *FEBS letters* **53**: 248-252

Herskovitz MA, Bechhofer DH (2000) Endoribonuclease RNase III is essential in Bacillus subtilis. *Molecular microbiology* **38**: 1027-1033

Higgins CF, Ames GF, Barnes WM, Clement JM, Hofnung M (1982) A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. *Nature* **298**: 760-762

Hirasawa T, Kumagai Y, Nagai K, Wachi M (2003) A Corynebacterium glutamicum rnhA recG double mutant showing lysozyme-sensitivity, temperature-sensitive growth, and UV-sensitivity. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **67**: 2416-2424

Hoagland MB, Stephenson ML, Scott JF, Hecht LI, Zamecnik PC (1958) A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *The Journal of biological chemistry* **231**: 241-257

Holmgren A (1979) Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action. *The Journal of biological chemistry* **254**: 9113-9119

Horie Y, Ito Y, Ono M, Moriwaki N, Kato H, Hamakubo Y, Amano T, Wachi M, Shirai M, Asayama M (2007) Dark-induced mRNA instability involves RNase E/G-type endoribonuclease cleavage at the AU-box and SD sequences in cyanobacteria. *Mol Genet Genomics* **278**: 331-346

Hsu S, Dickinson DP, Qin H, Lapp C, Lapp D, Borke J, Walsh DS, Bollag WB, Stoppler H, Yamamoto T, Osaki T, Schuster G (2005) Inhibition of autoantigen expression by (-)-epigallocatechin-3-gallate (the major constituent of green tea) in normal human cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **315**: 805-811

- Hsu S, Farrey K, Wataha J, Lewis J, Borke J, Singh B, Qin H, Lapp C, Lapp D, Nguyen T, Schuster G (2005) Role of p21WAF1 in green tea polyphenol-induced growth arrest and apoptosis of oral carcinoma cells. *Anticancer research* **25**: 63-67
- Hsu S, Qin H, Dickinson D, Xie D, Bollag WB, Stoppler H, Pearl H, Vu A, Watkins M, Koehler M, Schuster G (2007) Expression of caspase-14 reduces tumorigenicity of skin cancer cells. *In vivo (Athens, Greece)* **21**: 279-283
- Hsu S, Yamamoto T, Borke J, Walsh DS, Singh B, Rao S, Takaaki K, Nah-Do N, Lapp C, Lapp D, Foster E, Bollag WB, Lewis J, Wataha J, Osaki T, Schuster G (2005) Green tea polyphenol-induced epidermal keratinocyte differentiation is associated with coordinated expression of p57/KIP2 and caspase 14. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **312**: 884-890
- Huang H, Liao J, Cohen SN (1998) Poly(A)- and poly(U)-specific RNA 3' tail shortening by E. coli ribonuclease E. *Nature* **391**: 99-102
- Huang RC, Maheshwari N, Bonner J (1960) Enzymatic synthesis of RNA. *Biochemical and biophysical research communications* **3**: 689-694
- Huang S, Deutscher MP (1992) Sequence and transcriptional analysis of the Escherichia coli rnt gene encoding RNase T. *The Journal of biological chemistry* **267**: 25609-25613
- Hue KK, Cohen SD, Bechhofer DH (1995) A polypurine sequence that acts as a 5' mRNA stabilizer in Bacillus subtilis. *Journal of bacteriology* **177**: 3465-3471
- Hurwitz J, Bresler, A. and Diringier, R. (1960) The enzymic incorporation of ribonucleotides into polyribonucleotides and the effect of DNA. *Biochemical and biophysical research communications* **3**: 15-18
- Ikemura T, Dahlberg JE (1973) Small ribonucleic acids of Escherichia coli. I. Characterization by polyacrylamide gel electrophoresis and fingerprint analysis. *The Journal of biological chemistry* **248**: 5024-5032
- Inagawa T, Okamoto S, Wachi M, Ochi K (2003) RNase ES of Streptomyces coelicolor A3(2) can complement the rne and rng mutations in Escherichia coli. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **67**: 1767-1771
- Ingle CA, Kushner SR (1996) Development of an in vitro mRNA decay system for Escherichia coli: poly(A) polymerase I is necessary to trigger degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 12926-12931
- Inouye M, Shaw J, Shen C (1972) The assembly of a structural lipoprotein in the envelope of Escherichia coli. *The Journal of biological chemistry* **247**: 8154-8159
- Iost I, Dreyfus M (1995) The stability of Escherichia coli lacZ mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *The EMBO journal* **14**: 3252-3261
- Jacob F, Monod J (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of molecular biology* **3**: 318-356
- Jager S, Fuhrmann O, Heck C, Hebermehl M, Schiltz E, Rauhut R, Klug G (2001) An mRNA degrading complex in Rhodobacter capsulatus. *Nucleic acids research* **29**: 4581-4588
- Jagiello I, Beullens M, Stalmans W, Bollen M (1995) Subunit structure and regulation of protein phosphatase-1 in rat liver nuclei. *The Journal of biological chemistry* **270**: 17257-17263
- Jagiello I, Beullens M, Vulsteke V, Wera S, Sohlberg B, Stalmans W, von Gabain A, Bollen M (1997) NIPP-1, a nuclear inhibitory subunit of protein phosphatase-1, has RNA-binding properties. *The Journal of biological chemistry* **272**: 22067-22071
- Jain C, Belasco JG (1995) Autoregulation of RNase E synthesis in Escherichia coli. *Nucleic acids symposium series*: 85-88
- Jain C, Belasco JG (1995) RNase E autoregulates its synthesis by controlling the degradation rate of its own mRNA in Escherichia coli: unusual sensitivity of the rne transcript to RNase E activity. *Genes & development* **9**: 84-96

- Jain C, Deana A, Belasco JG (2002) Consequences of RNase E scarcity in Escherichia coli. *Molecular microbiology* **43**: 1053-1064
- Jain SK, Gurevitz M, Apirion D (1982) A small RNA that complements mutants in the RNA processing enzyme ribonuclease P. *Journal of molecular biology* **162**: 515-533
- Jain SK, Pragai B, Apirion D (1982) A possible complex containing RNA processing enzymes. *Biochemical and biophysical research communications* **106**: 768-778
- Jiang X, Belasco JG (2004) Catalytic activation of multimeric RNase E and RNase G by 5'-monophosphorylated RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 9211-9216
- Jiang X, Diwa A, Belasco JG (2000) Regions of RNase E important for 5'-end-dependent RNA cleavage and autoregulated synthesis. *Journal of bacteriology* **182**: 2468-2475
- Joho RH, Moorman JR, VanDongen AM, Kirsch GE, Silberberg H, Schuster G, Brown AM (1990) Toxin and kinetic profile of rat brain type III sodium channels expressed in Xenopus oocytes. *Brain research* **7**: 105-113
- Jourdan SS, McDowall KJ (2008) Sensing of 5' monophosphate by Escherichia coli RNase G can significantly enhance association with RNA and stimulate the decay of functional mRNA transcripts in vivo. *Molecular microbiology* **67**: 102-115
- Joyce SA, Dreyfus M (1998) In the absence of translation, RNase E can bypass 5' mRNA stabilizers in Escherichia coli. *Journal of molecular biology* **282**: 241-254
- Kaberdin VR, Bizebard T (2005) Characterization of Aquifex aeolicus RNase E/G. *Biochemical and biophysical research communications* **327**: 382-392
- Kaberdin VR, McDowall KJ (2003) Expanding the use of zymography by the chemical linkage of small, defined substrates to the gel matrix. *Genome research* **13**: 1961-1965
- Kaberdin VR, Miczak A, Jakobsen JS, Lin-Chao S, McDowall KJ, von Gabain A (1998) The endoribonucleolytic N-terminal half of Escherichia coli RNase E is evolutionarily conserved in Synechocystis sp. and other bacteria but not the C-terminal half, which is sufficient for degradosome assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 11637-11642
- Kaberdin VR, Walsh AP, Jakobsen T, McDowall KJ, von Gabain A (2000) Enhanced cleavage of RNA mediated by an interaction between substrates and the arginine-rich domain of E. coli ribonuclease E. *Journal of molecular biology* **301**: 257-264
- Kaga N, Umitsuki G, Clark DP, Nagai K, Wachi M (2002) Extensive overproduction of the AdhE protein by rng mutations depends on mutations in the cra gene or in the Cra-box of the adhE promoter. *Biochemical and biophysical research communications* **295**: 92-97
- Kaga N, Umitsuki G, Nagai K, Wachi M (2002) RNase G-dependent degradation of the eno mRNA encoding a glycolysis enzyme enolase in Escherichia coli. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **66**: 2216-2220
- Kalapos MP, Cao GJ, Kushner SR, Sarkar N (1994) Identification of a second poly(A) polymerase in Escherichia coli. *Biochemical and biophysical research communications* **198**: 459-465
- Kalman M, Murphy H, Cashel M (1991) rhlB, a new Escherichia coli K-12 gene with an RNA helicase-like protein sequence motif, one of at least five such possible genes in a prokaryote. *The New biologist* **3**: 886-895
- Kalmanson G, Bronfenbrenner J (1939) Studies on the Purification of Bacteriophage. *The Journal of general physiology* **23**: 203-228
- Kamada K, Hanaoka F (2005) Conformational change in the catalytic site of the ribonuclease YoeB toxin by YefM antitoxin. *Molecular cell* **19**: 497-509

- Keiler KC, Waller PR, Sauer RT (1996) Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science (New York, NY)* **271**: 990-993
- Kelly KO, Deutscher MP (1992) Characterization of Escherichia coli RNase PH. *The Journal of biological chemistry* **267**: 17153-17158
- Kelly KO, Deutscher MP (1992) The presence of only one of five exoribonucleases is sufficient to support the growth of Escherichia coli. *Journal of bacteriology* **174**: 6682-6684
- Kelly KO, Reuven NB, Li Z, Deutscher MP (1992) RNase PH is essential for tRNA processing and viability in RNase-deficient Escherichia coli cells. *The Journal of biological chemistry* **267**: 16015-16018
- Khemici V, Carpousis AJ (2004) The RNA degradosome and poly(A) polymerase of Escherichia coli are required in vivo for the degradation of small mRNA decay intermediates containing REP-stabilizers. *Molecular microbiology* **51**: 777-790
- Khemici V, Poljak L, Luisi BF, Carpousis AJ (2008) The RNase E of Escherichia coli is a membrane-binding protein. *Molecular microbiology* **70**: 799-813
- Khemici V, Poljak L, Toesca I, Carpousis AJ (2005) Evidence in vivo that the DEAD-box RNA helicase RhlB facilitates the degradation of ribosome-free mRNA by RNase E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 6913-6918
- Khemici V, Toesca I, Poljak L, Vanzo NF, Carpousis AJ (2004) The RNase E of Escherichia coli has at least two binding sites for DEAD-box RNA helicases: functional replacement of RhlB by RhlE. *Molecular microbiology* **54**: 1422-1430
- Kido M, Yamanaka K, Mitani T, Niki H, Ogura T, Hiraga S (1996) RNase E polypeptides lacking a carboxyl-terminal half suppress a mukB mutation in Escherichia coli. *Journal of bacteriology* **178**: 3917-3925
- Kim KS, Manasherob R, Cohen SN (2008) YmdB: a stress-responsive ribonuclease-binding regulator of E. coli RNase III activity. *Genes & development* **22**: 3497-3508
- Kim KT, Apirion D, Ghora BK (1978) Small stable RNA of Neurospora crassa. *Mol Gen Genet* **160**: 25-32
- Kime L, Jourdan SS, McDowall KJ (2008) Identifying and characterizing substrates of the RNase E/G family of enzymes. *Methods in enzymology* **447**: 215-241
- King TC, Schlessinger D (1983) S1 nuclease mapping analysis of ribosomal RNA processing in wild type and processing deficient Escherichia coli. *The Journal of biological chemistry* **258**: 12034-12042
- King TC, Sirdeshmukh R, Schlessinger D (1984) RNase III cleavage is obligate for maturation but not for function of Escherichia coli pre-23S rRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**: 185-188
- Kirschenbaum AH, Deutscher MP (1976) Amino acid acceptor activity of tRNA-C-C-C-A. *Biochemical and biophysical research communications* **70**: 258-264
- Klein BK, Staden A, Schlessinger D (1985) Electron microscopy of secondary structure in partially denatured precursor and mature Escherichia coli 16 S and 23 S rRNA. *The Journal of biological chemistry* **260**: 8114-8120
- Kloppstech K, Meyer G, Schuster G, Ohad I (1985) Synthesis, transport and localization of a nuclear coded 22-kd heat-shock protein in the chloroplast membranes of peas and Chlamydomonas reinhardtii. *The EMBO journal* **4**: 1901-1909
- Komarova AV, Tchufistova LS, Dreyfus M, Boni IV (2005) AU-rich sequences within 5' untranslated leaders enhance translation and stabilize mRNA in Escherichia coli. *Journal of bacteriology* **187**: 1344-1349
- Komine Y, Kikis E, Schuster G, Stern D (2002) Evidence for in vivo modulation of chloroplast RNA stability by 3'-UTR homopolymeric tails in Chlamydomonas reinhardtii. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 4085-4090

- Komine Y, Kwong L, Anguera MC, Schuster G, Stern DB (2000) Polyadenylation of three classes of chloroplast RNA in *Chlamydomonas reinhardtii*. *RNA (New York, NY)* **6**: 598-607
- Koonin EV, Deutscher MP (1993) RNase T shares conserved sequence motifs with DNA proofreading exonucleases. *Nucleic acids research* **21**: 2521-2522
- Kostage ST, Rizzo AP, Cohen SG (1967) Experimental eosinophilia XI. Cell responses to particles of delineated size. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* **125**: 413-416
- Kovacs L, Csanadi A, Kiss E, Miczak A (2005) Rv0802c acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica* **52**: 363-371
- Kovacs L, Csanadi A, Megyeri K, Kaberdin VR, Miczak A (2005) Mycobacterial RNase E-associated proteins. *Microbiology and immunology* **49**: 1003-1007
- Krainer AR, Mayeda A, Kozak D, Binns G (1991) Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K, and *Drosophila* splicing regulators. *Cell* **66**: 383-394
- Kunzmann A, Brennicke A, Marchfelder A (1998) 5' end maturation and RNA editing have to precede tRNA 3' processing in plant mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 108-113
- Kushner SR (2002) mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age. *Journal of bacteriology* **184**: 4658-4665; discussion 4657
- Kushner SR, Kaplan JC, Ono H, Grossman L (1971) Enzymatic repair of deoxyribonucleic acid. IV. Mechanism of photoproduct excision. *Biochemistry* **10**: 3325-3334
- Langkjaer RB, Casaregola S, Ussery DW, Gaillardin C, Piskur J (2003) Sequence analysis of three mitochondrial DNA molecules reveals interesting differences among *Saccharomyces* yeasts. *Nucleic acids research* **31**: 3081-3091
- Larimer FW, Hsu CL, Maupin MK, Stevens A (1992) Characterization of the XRN1 gene encoding a 5'→3' exoribonuclease: sequence data and analysis of disparate protein and mRNA levels of gene-disrupted yeast cells. *Gene* **120**: 51-57
- Laurent TC, Moore EC, Reichard P (1964) Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and Characterization of Thioredoxin, the Hydrogen Donor from *Escherichia Coli* B. *The Journal of biological chemistry* **239**: 3436-3444
- Le Derout J, Folichon M, Briani F, Deho G, Regnier P, Hajnsdorf E (2003) Hfq affects the length and the frequency of short oligo(A) tails at the 3' end of *Escherichia coli* rpsO mRNAs. *Nucleic acids research* **31**: 4017-4023
- Lederberg J, E. L. Tatum (1946) Gene recombination in *E. coli*. *Nature* **158**
- Lee K, Bernstein JA, Cohen SN (2002) RNase G complementation of *rne* null mutation identifies functional interrelationships with RNase E in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **43**: 1445-1456
- Lee K, Cohen SN (2001) Effects of 3' terminus modifications on mRNA functional decay during in vitro protein synthesis. *The Journal of biological chemistry* **276**: 23268-23274
- Lee K, Cohen SN (2003) A *Streptomyces coelicolor* functional orthologue of *Escherichia coli* RNase E shows shuffling of catalytic and PNPase-binding domains. *Molecular microbiology* **48**: 349-360
- Lee K, Zhan X, Gao J, Qiu J, Feng Y, Meganathan R, Cohen SN, Georgiou G (2003) RraA, a protein inhibitor of RNase E activity that globally modulates RNA abundance in *E. coli*. *Cell* **114**: 623-634
- Lefebvre CA, Schuster GS (1994) Biocompatibility of visible light-cured resin systems in prosthodontics. *The Journal of prosthetic dentistry* **71**: 178-185

- Lefebvre CA, Schuster GS, Marr JC, Knoernschild KL (1995) The effect of pH on the cytotoxicity of eluates from denture base resins. *The International journal of prosthodontics* **8**: 122-128
- Leroy A, Vanzo NF, Sousa S, Dreyfus M, Carpousis AJ (2002) Function in Escherichia coli of the non-catalytic part of RNase E: role in the degradation of ribosome-free mRNA. *Molecular microbiology* **45**: 1231-1243
- Lewis J, Nix L, Schuster G, Lefebvre C, Knoernschild K, Caughman G (1996) Response of oral mucosal cells to glass ionomer cements. *Biomaterials* **17**: 1115-1120
- Li de la Sierra-Gallay I, Mathy N, Pellegrini O, Condon C (2006) Structure of the ubiquitous 3' processing enzyme RNase Z bound to transfer RNA. *Nature structural & molecular biology* **13**: 376-377
- Li GY, Zhang Y, Chan MC, Mal TK, Hoeflich KP, Inouye M, Ikura M (2006) Characterization of dual substrate binding sites in the homodimeric structure of Escherichia coli mRNA interferase MazF. *Journal of molecular biology* **357**: 139-150
- Li Z, Deutscher MP (1994) The role of individual exoribonucleases in processing at the 3' end of Escherichia coli tRNA precursors. *The Journal of biological chemistry* **269**: 6064-6071
- Li Z, Deutscher MP (1995) The tRNA processing enzyme RNase T is essential for maturation of 5S RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 6883-6886
- Li Z, Deutscher MP (1996) Maturation pathways for E. coli tRNA precursors: a random multienzyme process in vivo. *Cell* **86**: 503-512
- Li Z, Deutscher MP (2002) RNase E plays an essential role in the maturation of Escherichia coli tRNA precursors. *RNA (New York, NY)* **8**: 97-109
- Li Z, Deutscher MP (2008) Analyzing the decay of stable RNAs in E. coli. *Methods in enzymology* **447**: 31-45
- Li Z, Pandit S, Deutscher MP (1998) 3' exoribonucleolytic trimming is a common feature of the maturation of small, stable RNAs in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 2856-2861
- Li Z, Pandit S, Deutscher MP (1999) Maturation of 23S ribosomal RNA requires the exoribonuclease RNase T. *RNA (New York, NY)* **5**: 139-146
- Li Z, Pandit S, Deutscher MP (1999) RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *The EMBO journal* **18**: 2878-2885
- Li Z, Reimers S, Pandit S, Deutscher MP (2002) RNA quality control: degradation of defective transfer RNA. *The EMBO journal* **21**: 1132-1138
- Li Z, Zhan L, Deutscher MP (1996) Escherichia coli RNase T functions in vivo as a dimer dependent on cysteine 168. *The Journal of biological chemistry* **271**: 1133-1137
- Li Z, Zhan L, Deutscher MP (1996) The role of individual cysteine residues in the activity of Escherichia coli RNase T. *The Journal of biological chemistry* **271**: 1127-1132
- Li-Hawkins J, Gafvels M, Olin M, Lund EG, Andersson U, Schuster G, Bjorkhem I, Russell DW, Eggertsen G (2002) Cholic acid mediates negative feedback regulation of bile acid synthesis in mice. *The Journal of clinical investigation* **110**: 1191-1200
- Lim CJ, Haller B, Fuchs JA (1985) Thioredoxin is the bacterial protein encoded by fip that is required for filamentous bacteriophage f1 assembly. *Journal of bacteriology* **161**: 799-802
- Lin-Chao S, Chiou NT, Schuster G (2007) The PNPase, exosome and RNA helicases as the building components of evolutionarily-conserved RNA degradation machines. *Journal of biomedical science* **14**: 523-532

- Lin-Chao S, Cohen SN (1991) The rate of processing and degradation of antisense RNAI regulates the replication of ColE1-type plasmids in vivo. *Cell* **65**: 1233-1242
- Lin-Chao S, Wong TT, McDowall KJ, Cohen SN (1994) Effects of nucleotide sequence on the specificity of rne-dependent and RNase E-mediated cleavages of RNA I encoded by the pBR322 plasmid. *The Journal of biological chemistry* **269**: 10797-10803
- Linder P, Lasko PF, Ashburner M, Leroy P, Nielsen PJ, Nishi K, Schnier J, Slonimski PP (1989) Birth of the D-E-A-D box. *Nature* **337**: 121-122
- Liou GG, Jane WN, Cohen SN, Lin NS, Lin-Chao S (2001) RNA degradosomes exist in vivo in Escherichia coli as multicomponent complexes associated with the cytoplasmic membrane via the N-terminal region of ribonuclease E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 63-68
- Lisitsky I, Klaff P, Schuster G (1996) Addition of destabilizing poly (A)-rich sequences to endonuclease cleavage sites during the degradation of chloroplast mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 13398-13403
- Lisitsky I, Kotler A, Schuster G (1997) The mechanism of preferential degradation of polyadenylated RNA in the chloroplast. The exoribonuclease 100RNP/polynucleotide phosphorylase displays high binding affinity for poly(A) sequence. *The Journal of biological chemistry* **272**: 17648-17653
- Lisitsky I, Liveanu V, Schuster G (1994) RNA-binding activities of the different domains of a spinach chloroplast ribonucleoprotein. *Nucleic acids research* **22**: 4719-4724
- Lisitsky I, Liveanu V, Schuster G (1995) RNA-Binding Characteristics of a Ribonucleoprotein from Spinach Chloroplast. *Plant physiology* **107**: 933-941
- Lisitsky I, Rott R, Schuster G (2001) Insertion of polydeoxyadenosine-rich sequences into an intergenic region increases transcription in Chlamydomonas reinhardtii chloroplasts. *Planta* **212**: 851-857
- Lisitsky I, Schuster G (1995) A method to determine the minimal number of nucleotides required for the binding of a ribonucleoprotein to RNA. *Analytical biochemistry* **224**: 603-605
- Lisitsky I, Schuster G (1995) Phosphorylation of a chloroplast RNA-binding protein changes its affinity to RNA. *Nucleic acids research* **23**: 2506-2511
- Lisitsky I, Schuster G (1999) Preferential degradation of polyadenylated and polyuridinylated RNAs by the bacterial exoribonuclease polynucleotide phosphorylase. *European journal of biochemistry / FEBS* **261**: 468-474
- Littauer UZ, Kornberg A (1957) Reversible synthesis of polyribonucleotides with an enzyme from Escherichia coli. *The Journal of biological chemistry* **226**: 1077-1092
- Loayza D, Carpousis AJ, Krisch HM (1991) Gene 32 transcription and mRNA processing in T4-related bacteriophages. *Molecular microbiology* **5**: 715-725
- Loayza D, Carpousis AJ, Krisch HM (1991) Gene 32 transcription and mRNA processing in T4-related bacteriophages. *Molecular microbiology* **5**: 715-725
- Löffler M, Jockel J, Schuster G, Becker C (1997) Dihydroorotat-ubiquinone oxidoreductase links mitochondria in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides. *Molecular and cellular biochemistry* **174**: 125-129
- Lopez PJ, Dreyfus M (1996) The lacZ mRNA can be stabilised by the T7 late mRNA leader in E coli. *Biochimie* **78**: 408-415
- Lopez PJ, Marchand I, Joyce SA, Dreyfus M (1999) The C-terminal half of RNase E, which organizes the Escherichia coli degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo. *Molecular microbiology* **33**: 188-199

- Lopez PJ, Marchand I, Yarchuk O, Dreyfus M (1998) Translation inhibitors stabilize Escherichia coli mRNAs independently of ribosome protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 6067-6072
- Lorentzen E, Conti E (2005) Structural basis of 3' end RNA recognition and exoribonucleolytic cleavage by an exosome RNase PH core. *Molecular cell* **20**: 473-481
- Lorentzen E, Walter P, Fribourg S, Evguenieva-Hackenberg E, Klug G, Conti E (2005) The archaeal exosome core is a hexameric ring structure with three catalytic subunits. *Nature structural & molecular biology* **12**: 575-581
- Lung B, Zemmann A, Madej MJ, Schuelke M, Techritz S, Ruf S, Bock R, Huttenhofer A (2006) Identification of small non-coding RNAs from mitochondria and chloroplasts. *Nucleic acids research* **34**: 3842-3852
- Luo D, Condon C, Grunberg-Manago M, Putzer H (1998) In vitro and in vivo secondary structure probing of the thrS leader in Bacillus subtilis. *Nucleic acids research* **26**: 5379-5387
- Luria SE (1947) Recent advances in bacterial genetics. *Bacteriological reviews* **11**: 1-40
- Luria SE, Delbruck M (1943) Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics* **28**: 491-511
- Lutkenhaus J (1993) FtsZ ring in bacterial cytokinesis. *Molecular microbiology* **9**: 403-409
- Lytle JR, Wu L, Robertson HD (2002) Domains on the hepatitis C virus internal ribosome entry site for 40s subunit binding. *RNA (New York, NY)* **8**: 1045-1055
- Lytle JR, Wu L, Robertson HD (2002) Domains on the hepatitis C virus internal ribosome entry site for 40s subunit binding. *RNA (New York, NY)* **8**: 1045-1055
- Mackie GA (1989) Stabilization of the 3' one-third of Escherichia coli ribosomal protein S20 mRNA in mutants lacking polynucleotide phosphorylase. *Journal of bacteriology* **171**: 4112-4120
- Mackie GA (1991) Specific endonucleolytic cleavage of the mRNA for ribosomal protein S20 of Escherichia coli requires the product of the ams gene in vivo and in vitro. *Journal of bacteriology* **173**: 2488-2497
- Mackie GA (1992) Secondary structure of the mRNA for ribosomal protein S20. Implications for cleavage by ribonuclease E. *The Journal of biological chemistry* **267**: 1054-1061
- Mackie GA (1998) Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature* **395**: 720-723
- Mackie GA (2000) Stabilization of circular rpsT mRNA demonstrates the 5'-end dependence of RNase E action in vivo. *The Journal of biological chemistry* **275**: 25069-25072
- Mackie GA, Coburn GA, Miao X, Briant DJ, Prud'homme-Genereux A (2001) Preparation of Escherichia coli Rne protein and reconstitution of RNA degradosome. *Methods in enzymology* **342**: 346-356
- Mackie GA, Coburn GA, Miao X, Briant DJ, Prud'homme-Genereux A, Stickney LM, Hankins JS (2008) Preparation of the Escherichia coli RNase E protein and reconstitution of the RNA degradosome. *Methods in enzymology* **447**: 199-213
- Mackie GA, Genereux JL (1993) The role of RNA structure in determining RNase E-dependent cleavage sites in the mRNA for ribosomal protein S20 in vitro. *Journal of molecular biology* **234**: 998-1012
- Mackie GA, Genereux JL, Masterman SK (1997) Modulation of the activity of RNase E in vitro by RNA sequences and secondary structures 5' to cleavage sites. *The Journal of biological chemistry* **272**: 609-616
- Mackie GA, Zimmermann RA (1975) Characterization of fragments of 16 S ribonucleic acid protected against pancreatic ribonuclease digestion by ribosomal protein S4. *The Journal of biological chemistry* **250**: 4100-4112

- Mahler I, Kushner SR, Grossman L (1971) In vivo role of the UV-endonuclease from *Micrococcus luteus* in the repair of DNA. *Nature: New biology* **234**: 47-50
- Mailhot JM, Schuster GS, Garnick JJ, Hanes PJ, Lapp CA, Lewis JB (1995) Human periodontal ligament and gingival fibroblast response to TGF-beta 1 stimulation. *Journal of clinical periodontology* **22**: 679-685
- Majdalani N, Vanderpool CK, Gottesman S (2005) Bacterial small RNA regulators. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **40**: 93-113
- Makarov EM, Apirion D (1992) 10Sa RNA: processing by and inhibition of RNase III. *Biochemistry international* **26**: 1115-1124
- Makarova OV, Makarov EM, Sousa R, Dreyfus M (1995) Transcribing of *Escherichia coli* genes with mutant T7 RNA polymerases: stability of lacZ mRNA inversely correlates with polymerase speed. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 12250-12254
- Manam S, Van Tuyle GC (1987) Separation and characterization of 5'- and 3'-tRNA processing nucleases from rat liver mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **262**: 10272-10279
- Maquat LE (1995) When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells. *RNA (New York, NY)* **1**: 453-465
- Marcaida MJ, DePristo MA, Chandran V, Carpousis AJ, Luisi BF (2006) The RNA degradosome: life in the fast lane of adaptive molecular evolution. *Trends in biochemical sciences* **31**: 359-365
- Marchand I, Nicholson AW, Dreyfus M (2001) Bacteriophage T7 protein kinase phosphorylates RNase E and stabilizes mRNAs synthesized by T7 RNA polymerase. *Molecular microbiology* **42**: 767-776
- Margolin W (2005) FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 862-871
- Mark DF, Richardson CC (1976) *Escherichia coli* thioredoxin: a subunit of bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**: 780-784
- Marotta CA, Forget BG, Cohen-Solal M, Weissman SM (1976) Nucleotide sequence analysis of coding and noncoding regions of human beta-globin mRNA. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **19**: 165-175
- Martin FH, Tinoco I, Jr. (1980) DNA-RNA hybrid duplexes containing oligo(dA:rU) sequences are exceptionally unstable and may facilitate termination of transcription. *Nucleic acids research* **8**: 2295-2299
- Masse E, Escorcía FE, Gottesman S (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes & development* **17**: 2374-2383
- Masse E, Salvail H, Desnoyers G, Arguin M (2007) Small RNAs controlling iron metabolism. *Current opinion in microbiology* **10**: 140-145
- Masters M, Colloms MD, Oliver IR, He L, Macnaughton EJ, Charters Y (1993) The *pcnB* gene of *Escherichia coli*, which is required for ColE1 copy number maintenance, is dispensable. *Journal of bacteriology* **175**: 4405-4413
- Masters M, March JB, Oliver IR, Collins JF (1990) A possible role for the *pcnB* gene product of *Escherichia coli* in modulating RNA: RNA interactions. *Mol Gen Genet* **220**: 341-344
- Mathy N, Benard L, Pellegrini O, Daou R, Wen T, Condon C (2007) 5'-to-3' exoribonuclease activity in bacteria: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA. *Cell* **129**: 681-692
- Mayer M, Schiffer S, Marchfelder A (2000) tRNA 3' processing in plants: nuclear and mitochondrial activities differ. *Biochemistry* **39**: 2096-2105

- McDowall KJ, Cohen SN (1996) The N-terminal domain of the rne gene product has RNase E activity and is non-overlapping with the arginine-rich RNA-binding site. *Journal of molecular biology* **255**: 349-355
- McDowall KJ, Hernandez RG, Lin-Chao S, Cohen SN (1993) The ams-1 and rne-3071 temperature-sensitive mutations in the ams gene are in close proximity to each other and cause substitutions within a domain that resembles a product of the Escherichia coli mre locus. *Journal of bacteriology* **175**: 4245-4249
- McDowall KJ, Kaberdin VR, Wu SW, Cohen SN, Lin-Chao S (1995) Site-specific RNase E cleavage of oligonucleotides and inhibition by stem-loops. *Nature* **374**: 287-290
- McDowall KJ, Lin-Chao S, Cohen SN (1994) A+U content rather than a particular nucleotide order determines the specificity of RNase E cleavage. *The Journal of biological chemistry* **269**: 10790-10796
- Mechold U, Ogryzko V, Ngo S, Danchin A (2006) Oligoribonuclease is a common downstream target of lithium-induced pAp accumulation in Escherichia coli and human cells. *Nucleic acids research* **34**: 2364-2373
- Meierhoff K, Felder S, Nakamura T, Bechtold N, Schuster G (2003) HCF152, an Arabidopsis RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast psbB-psbT-psbH-petB-petD RNAs. *The Plant cell* **15**: 1480-1495
- Menzel G, Stenz E, Toure IM, Gebler B, Schuster G (1975) [Effect of several plant growth regulators on various prokaryotes and their viruses]. *Zeitschrift fur allgemeine Mikrobiologie* **15**: 259-268
- Miczak A (1995) The entire rne gene: the remaining questions. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica* **42**: 309-314
- Miczak A, Apirion D (1993) The rne gene and ribonuclease E. *Biochimie* **75**: 473-479
- Miczak A, Ford J, Marian M, Apirion D (1983) RNA processing: new mutants that affect endonucleolytic processing of RNA. *Biochemical and biophysical research communications* **114**: 690-698
- Miczak A, Kaberdin VR, Wei CL, Lin-Chao S (1996) Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 3865-3869
- Miczak A, Srivastava RA, Apirion D (1991) Location of the RNA-processing enzymes RNase III, RNase E and RNase P in the Escherichia coli cell. *Molecular microbiology* **5**: 1801-1810
- Mikulik K (2003) Structure and functional properties of prokaryotic small noncoding RNAs. *Folia microbiologica* **48**: 443-468
- Misra TK, Apirion D (1978) Characterization of an endoribonuclease, RNase N, from Escherichia coli. *The Journal of biological chemistry* **253**: 5594-5599
- Misra TK, Apirion D (1979) RNase E, an RNA processing enzyme from Escherichia coli. *The Journal of biological chemistry* **254**: 11154-11159
- Misra TK, Apirion D (1980) Gene rne affects the structure of the ribonucleic acid-processing enzyme ribonuclease E of Escherichia coli. *Journal of bacteriology* **142**: 359-361
- Mizuno T, Chou, M.Y., and Inouye, M. (1983) Regulation of gene expression by a small RNA transcript (MicRNA) in Escherichia coli K-12. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **59**: 335-338
- Mizuno T, Chou MY, Inouye M (1984) A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**: 1966-1970
- Mohanty BK, Kushner SR (1999) Analysis of the function of Escherichia coli poly(A) polymerase I in RNA metabolism. *Molecular microbiology* **34**: 1094-1108

- Mohanty BK, Kushner SR (1999) Residual polyadenylation in poly(A) polymerase I (pcnB) mutants of Escherichia coli does not result from the activity encoded by the f310 gene. *Molecular microbiology* **34**: 1109-1119
- Mohanty BK, Kushner SR (2000) Polynucleotide phosphorylase functions both as a 3' right-arrow 5' exonuclease and a poly(A) polymerase in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 11966-11971
- Mohanty BK, Kushner SR (2000) Polynucleotide phosphorylase, RNase II and RNase E play different roles in the in vivo modulation of polyadenylation in Escherichia coli. *Molecular microbiology* **36**: 982-994
- Mohanty BK, Kushner SR (2002) Polyadenylation of Escherichia coli transcripts plays an integral role in regulating intracellular levels of polynucleotide phosphorylase and RNase E. *Molecular microbiology* **45**: 1315-1324
- Mohanty BK, Kushner SR (2003) Genomic analysis in Escherichia coli demonstrates differential roles for polynucleotide phosphorylase and RNase II in mRNA abundance and decay. *Molecular microbiology* **50**: 645-658
- Mohanty BK, Kushner SR (2007) Ribonuclease P processes polycistronic tRNA transcripts in Escherichia coli independent of ribonuclease E. *Nucleic acids research* **35**: 7614-7625
- Mohanty BK, Kushner SR (2008) Rho-independent transcription terminators inhibit RNase P processing of the secG leuU and metT tRNA polycistronic transcripts in Escherichia coli. *Nucleic acids research* **36**: 364-375
- Mohanty BK, Maples VF, Kushner SR (2004) The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in Escherichia coli. *Molecular microbiology* **54**: 905-920
- Moll I, Afonyushkin T, Vytvytska O, Kaberdin VR, Blasi U (2003) Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs. *RNA (New York, NY)* **9**: 1308-1314
- Moller T, Franch T, Hojrup P, Keene DR, Bachinger HP, Brennan RG, Valentin-Hansen P (2002) Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Molecular cell* **9**: 23-30
- Monde RA, Schuster G, Stern DB (2000) Processing and degradation of chloroplast mRNA. *Biochimie* **82**: 573-582
- Monod J (1949) Adaptation, mutation and segregation in relation to the synthesis of enzymes by bacteria. *The Biochemical journal* **44**: xix
- Monod J, Wollman E (1947) [Not Available.]. *Annales de l'Institut Pasteur* **73**: 937-956
- Moreau PL, Gerard F, Lutz NW, Cozzone P (2001) Non-growing Escherichia coli cells starved for glucose or phosphate use different mechanisms to survive oxidative stress. *Molecular microbiology* **39**: 1048-1060
- Morita T, Kawamoto H, Mizota T, Inada T, Aiba H (2004) Enolase in the RNA degradosome plays a crucial role in the rapid decay of glucose transporter mRNA in the response to phosphosugar stress in Escherichia coli. *Molecular microbiology* **54**: 1063-1075
- Morita T, Maki K, Aiba H (2005) RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes & development* **19**: 2176-2186
- Morita T, Mochizuki Y, Aiba H (2006) Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 4858-4863
- Mudd EA, Carpousis AJ, Krisch HM (1990) Escherichia coli RNase E has a role in the decay of bacteriophage T4 mRNA. *Genes & development* **4**: 873-881
- Mudd EA, Higgins CF (1993) Escherichia coli endoribonuclease RNase E: autoregulation of expression and site-specific cleavage of mRNA. *Molecular microbiology* **9**: 557-568

- Mudd EA, Krisch HM, Higgins CF (1990) RNase E, an endoribonuclease, has a general role in the chemical decay of Escherichia coli mRNA: evidence that rne and ams are the same genetic locus. *Molecular microbiology* **4**: 2127-2135
- Mudd EA, Prentki P, Belin D, Krisch HM (1988) Processing of unstable bacteriophage T4 gene 32 mRNAs into a stable species requires Escherichia coli ribonuclease E. *The EMBO journal* **7**: 3601-3607
- Muffler A, Fischer D, Hengge-Aronis R (1996) The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Qbeta RNA replication, is essential for rpoS translation in Escherichia coli. *Genes & development* **10**: 1143-1151
- Mukherjee A, Donachie WD (1990) Differential translation of cell division proteins. *Journal of bacteriology* **172**: 6106-6111
- Nakamura T, Meierhoff K, Westhoff P, Schuster G (2003) RNA-binding properties of HCF152, an Arabidopsis PPR protein involved in the processing of chloroplast RNA. *European journal of biochemistry / FEBS* **270**: 4070-4081
- Nakamura T, Schuster G, Sugiura M, Sugita M (2004) Chloroplast RNA-binding and pentatricopeptide repeat proteins. *Biochemical Society transactions* **32**: 571-574
- Natale DA, Galperin MY, Tatusov RL, Koonin EV (2000) Using the COG database to improve gene recognition in complete genomes. *Genetica* **108**: 9-17
- Negrutskii BS, Deutscher MP (1992) A sequestered pool of aminoacyl-tRNA in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 3601-3604
- Neidhardt FC (1987) *Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology*
Vol. 1: American Society for Microbiology.
- Newbury SF, Smith NH, Higgins CF (1987) Differential mRNA stability controls relative gene expression within a polycistronic operon. *Cell* **51**: 1131-1143
- Newbury SF, Smith NH, Robinson EC, Hiles ID, Higgins CF (1987) Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. *Cell* **48**: 297-310
- Nicholson AW, Niebling KR, McOsker PL, Robertson HD (1988) Accurate in vitro cleavage by RNase III of phosphorothioate-substituted RNA processing signals in bacteriophage T7 early mRNA. *Nucleic acids research* **16**: 1577-1591
- Nierlich DP, Murakawa GJ (1996) The decay of bacterial messenger RNA. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **52**: 153-216
- Nishio SY, Itoh T (2009) Arginine-rich RNA binding domain and protein scaffold domain of RNase E are important for degradation of RNAI but not for that of the Rep mRNA of the ColE2 plasmid. *Plasmid* **62**: 83-87
- Niyogi SK, Datta AK (1975) A novel oligoribonuclease of Escherichia coli. I. Isolation and properties. *The Journal of biological chemistry* **250**: 7307-7312
- Oda K, Yamato K, Ohta E, Nakamura Y, Takemura M, Nozato N, Akashi K, Ohyama K (1992) Transfer RNA genes in the mitochondrial genome from a liverwort, Marchantia polymorpha: the absence of chloroplast-like tRNAs. *Nucleic acids research* **20**: 3773-3777
- Odaert B, Saida F, Aliprandi P, Durand S, Crechet JB, Guerois R, Laalami S, Uzan M, Bontems F (2007) Structural and functional studies of RegB, a new member of a family of sequence-specific ribonucleases involved in mRNA inactivation on the ribosome. *The Journal of biological chemistry* **282**: 2019-2028
- O'Hara EB, Chekanova JA, Ingle CA, Kushner ZR, Peters E, Kushner SR (1995) Polyadenylation helps regulate mRNA decay in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 1807-1811
- Okada Y, Wachi M, Hirata A, Suzuki K, Nagai K, Matsushashi M (1994) Cytoplasmic axial filaments in Escherichia coli cells: possible function in the mechanism of chromosome segregation and cell division. *Journal of bacteriology* **176**: 917-922

- Omer CA, Cohen SN (1986) Structural analysis of plasmid and chromosomal loci involved in site-specific excision and integration of the SLP1 element of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology* **166**: 999-1006
- Ono M, Kuwano M (1979) A conditional lethal mutation in an *Escherichia coli* strain with a longer chemical lifetime of messenger RNA. *Journal of molecular biology* **129**: 343-357
- Oommen A, Li XQ, Gegenheimer P (1992) Cleavage specificity of chloroplast and nuclear tRNA 3'-processing nucleases. *Molecular and cellular biology* **12**: 865-875
- Oppenheim AB, Kornitzer D, Altuvia S, Court DL (1993) Posttranscriptional control of the lysogenic pathway in bacteriophage lambda. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **46**: 37-49
- Ost KA, Deutscher MP (1990) RNase PH catalyzes a synthetic reaction, the addition of nucleotides to the 3' end of RNA. *Biochimie* **72**: 813-818
- Ost KA, Deutscher MP (1991) *Escherichia coli* orfE (upstream of pyrE) encodes RNase PH. *Journal of bacteriology* **173**: 5589-5591
- Ow MC, Kushner SR (2002) Initiation of tRNA maturation by RNase E is essential for cell viability in *E. coli*. *Genes & development* **16**: 1102-1115
- Ow MC, Liu Q, Kushner SR (2000) Analysis of mRNA decay and rRNA processing in *Escherichia coli* in the absence of RNase E-based degradosome assembly. *Molecular microbiology* **38**: 854-866
- Ow MC, Liu Q, Mohanty BK, Andrew ME, Maples VF, Kushner SR (2002) RNase E levels in *Escherichia coli* are controlled by a complex regulatory system that involves transcription of the rne gene from three promoters. *Molecular microbiology* **43**: 159-171
- Ow MC, Perwez T, Kushner SR (2003) RNase G of *Escherichia coli* exhibits only limited functional overlap with its essential homologue, RNase E. *Molecular microbiology* **49**: 607-622
- Pace B, Matthews EA, Johnson KD, Cantor CR, Pace NR (1982) Conserved 5S rRNA complement to tRNA is not required for protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**: 36-40
- Paddock GV, Fukada K, Abelson J, Robertson HD (1976) Cleavage of T4 species I ribonucleic acid by *Escherichia coli* ribonuclease III. *Nucleic acids research* **3**: 1351-1371
- Paddock GV, Fukada K, Abelson J, Robertson HD (1976) Cleavage of T4 species I ribonucleic acid by *Escherichia coli* ribonuclease III. *Nucleic acids research* **3**: 1351-1371
- Padmanabha KP, Deutscher MP (1991) RNase T affects *Escherichia coli* growth and recovery from metabolic stress. *Journal of bacteriology* **173**: 1376-1381
- Paget MS, Helmann JD (2003) The sigma70 family of sigma factors. *Genome biology* **4**: 203
- Palmer JR, Nieuwlandt DT, Daniels CJ (1994) Expression of a yeast intron-containing tRNA in the archaeon *Haloferax volcanii*. *Journal of bacteriology* **176**: 3820-3823
- Pandey DP, Gerdes K (2005) Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic acids research* **33**: 966-976
- Pellegrini O, Mathy N, Condon C, Benard L (2008) In vitro assays of 5' to 3'-exoribonuclease activity. *Methods in enzymology* **448**: 167-183
- Pellegrini O, Mathy N, Gogos A, Shapiro L, Condon C (2005) The *Bacillus subtilis* ydcDE operon encodes an endoribonuclease of the MazF/PemK family and its inhibitor. *Molecular microbiology* **56**: 1139-1148

- Pellegrini O, Nezzar J, Marchfelder A, Putzer H, Condon C (2003) Endonucleolytic processing of CCA-less tRNA precursors by RNase Z in *Bacillus subtilis*. *The EMBO journal* **22**: 4534-4543
- Perwez T, Hami D, Maples VF, Min Z, Wang BC, Kushner SR (2008) Intragenic suppressors of temperature-sensitive *rne* mutations lead to the dissociation of RNase E activity on mRNA and tRNA substrates in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research* **36**: 5306-5318
- Perwez T, Kushner SR (2006) RNase Z in *Escherichia coli* plays a significant role in mRNA decay. *Molecular microbiology* **60**: 723-737
- Pfeiffer V, Papenfort K, Lucchini S, Hinton JC, Vogel J (2009) Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nature structural & molecular biology* **16**: 840-846
- Plautz G, Apirion D (1981) Processing of RNA in *Escherichia coli* is limited in the absence of ribonuclease III, ribonuclease E and ribonuclease P. *Journal of molecular biology* **149**: 813-819
- Porse BT, Garrett RA (1999) Ribosomal mechanics, antibiotics, and GTP hydrolysis. *Cell* **97**: 423-426
- Portier C, Dondon L, Grunberg-Manago M, Regnier P (1987) The first step in the functional inactivation of the *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase messenger is a ribonuclease III processing at the 5' end. *The EMBO journal* **6**: 2165-2170
- Portnoy V, Evguenieva-Hackenberg E, Klein F, Walter P, Lorentzen E, Klug G, Schuster G (2005) RNA polyadenylation in Archaea: not observed in *Haloferax* while the exosome polynucleotidylates RNA in *Sulfolobus*. *EMBO reports* **6**: 1188-1193
- Portnoy V, Palnizky G, Yehudai-Resheff S, Glaser F, Schuster G (2008) Analysis of the human polynucleotide phosphorylase (PNPase) reveals differences in RNA binding and response to phosphate compared to its bacterial and chloroplast counterparts. *RNA (New York, NY)* **14**: 297-309
- Portnoy V, Schuster G (2006) RNA polyadenylation and degradation in different Archaea; roles of the exosome and RNase R. *Nucleic acids research* **34**: 5923-5931
- Portnoy V, Schuster G (2008) *Mycoplasma gallisepticum* as the first analyzed bacterium in which RNA is not polyadenylated. *FEMS microbiology letters* **283**: 97-103
- Pragai B, Apirion D (1981) Processing of bacteriophage T4 tRNAs. The role of RNAase III. *Journal of molecular biology* **153**: 619-630
- Pragai B, Apirion D (1982) Processing of bacteriophage T4 transfer RNAs. Structural analysis and in vitro processing of precursors that accumulate in RNase E-strains. *Journal of molecular biology* **154**: 465-484
- Pragai B, Ko TS, Apirion D (1980) Processing of bacteriophage T4 tRNAs: an RNAase III- strain contains a precursor for tRNA^{Gln} and tRNA^{Leu}. *Biochemical and biophysical research communications* **95**: 1431-1436
- Prasher DC, Conarro L, Kushner SR (1983) Amplification and purification of exonuclease I from *Escherichia coli* K12. *The Journal of biological chemistry* **258**: 6340-6343
- Proux F, Dreyfus M (2008) Construction and characterization of *E. coli* K12 strains in which the transcription of selected genes is desynchronized from translation. *Methods in enzymology* **447**: 243-258
- Prud'homme-Genereux A, Beran RK, Iost I, Ramey CS, Mackie GA, Simons RW (2004) Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock protein, CsdA: evidence for a 'cold shock degradosome'. *Molecular microbiology* **54**: 1409-1421
- Purusharth RI, Klein F, Sulthana S, Jager S, Jagannadham MV, Evguenieva-Hackenberg E, Ray MK, Klug G (2005) Exoribonuclease R interacts with endoribonuclease E and an RNA helicase in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae* Lz4W. *The Journal of biological chemistry* **280**: 14572-14578

- Putzer H, Condon C, Brechemier-Baey D, Brito R, Grunberg-Manago M (2002) Transfer RNA-mediated antitermination in vitro. *Nucleic acids research* **30**: 3026-3033
- Putzer H, Laalami S, Brakhage AA, Condon C, Grunberg-Manago M (1995) Aminoacyl-tRNA synthetase gene regulation in *Bacillus subtilis*: induction, repression and growth-rate regulation. *Molecular microbiology* **16**: 709-718
- Py B, Causton H, Mudd EA, Higgins CF (1994) A protein complex mediating mRNA degradation in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **14**: 717-729
- Py B, Higgins CF, Krisch HM, Carpousis AJ (1996) A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature* **381**: 169-172
- Quinet EM, Savio DA, Halpern AR, Chen L, Schuster GU, Gustafsson JA, Basso MD, Nambi P (2006) Liver X receptor (LXR)-beta regulation in LXRalpha-deficient mice: implications for therapeutic targeting. *Molecular pharmacology* **70**: 1340-1349
- Rapaport LR, Mackie GA (1994) Influence of translational efficiency on the stability of the mRNA for ribosomal protein S20 in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **176**: 992-998
- Rauhut R, Klug G (1999) mRNA degradation in bacteria. *FEMS microbiology reviews* **23**: 353-370
- Ray A, Apirion D (1980) Cloning the gene for ribonuclease E, an RNA processing enzyme. *Gene* **12**: 87-94
- Ray A, Apirion D (1982) Characterization of DNA from the rne gene of *Escherichia coli*: uniqueness of the rne DNA. *Biochemical and biophysical research communications* **107**: 1361-1367
- Ray BK, Apirion D (1979) Characterization of 10S RNA: a new stable rna molecule from *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **174**: 25-32
- Ray BK, Apirion D (1981) RNAase P is dependent on RNAase E action in processing monomeric RNA precursors that accumulate in an RNAase E- mutant of *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* **149**: 599-617
- Ray BK, Apirion D (1981) Transfer RNA precursors are accumulated in *Escherichia coli* in the absence of RNase E. *European journal of biochemistry / FEBS* **114**: 517-524
- Ray BK, Singh B, Roy MK, Apirion D (1982) Ribonuclease E is involved in the processing of 5-S rRNA from a number of rRNA transcription units. *European journal of biochemistry / FEBS* **125**: 283-289
- RayChaudhuri D, Park JT (1992) *Escherichia coli* cell-division gene ftsZ encodes a novel GTP-binding protein. *Nature* **359**: 251-254
- Raynal LC, Carpousis AJ (1999) Poly(A) polymerase I of *Escherichia coli*: characterization of the catalytic domain, an RNA binding site and regions for the interaction with proteins involved in mRNA degradation. *Molecular microbiology* **32**: 765-775
- Redko Y, Bechhofer DH, Condon C (2008) Mini-III, an unusual member of the RNase III family of enzymes, catalyses 23S ribosomal RNA maturation in *B. subtilis*. *Molecular microbiology* **68**: 1096-1106
- Redko Y, Condon C Maturation of 23S rRNA in *Bacillus subtilis* in the absence of Mini-III. *Journal of bacteriology* **192**: 356-359
- Redko Y, Condon C (2009) Ribosomal protein L3 bound to 23S precursor rRNA stimulates its maturation by Mini-III ribonuclease. *Molecular microbiology* **71**: 1145-1154
- Redko Y, Li de Lasierra-Gallay I, Condon C (2007) When all's zed and done: the structure and function of RNase Z in prokaryotes. *Nature reviews* **5**: 278-286

- Redko Y, Tock MR, Adams CJ, Kaberdin VR, Grasby JA, McDowall KJ (2003) Determination of the catalytic parameters of the N-terminal half of Escherichia coli ribonuclease E and the identification of critical functional groups in RNA substrates. *The Journal of biological chemistry* **278**: 44001-44008
- Regnier P, Arraiano CM (2000) Degradation of mRNA in bacteria: emergence of ubiquitous features. *Bioessays* **22**: 235-244
- Regnier P, Grunberg-Manago M (1989) Cleavage by RNase III in the transcripts of the met Y-nus-A-infB operon of Escherichia coli releases the tRNA and initiates the decay of the downstream mRNA. *Journal of molecular biology* **210**: 293-302
- Regnier P, Grunberg-Manago M, Portier C (1987) Nucleotide sequence of the pnp gene of Escherichia coli encoding polynucleotide phosphorylase. Homology of the primary structure of the protein with the RNA-binding domain of ribosomal protein S1. *The Journal of biological chemistry* **262**: 63-68
- Rehning A, Schuster G (1978) [Structurally dependent effects of substituted thioureas on rna phage m 12 (author's transl)]. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* **133**: 528-532
- Rehwinkel J, Natalin P, Stark A, Brennecke J, Cohen SM, Izaurralde E (2006) Genome-wide analysis of mRNAs regulated by Drosha and Argonaute proteins in Drosophila melanogaster. *Molecular and cellular biology* **26**: 2965-2975
- Repoila F, Darfeuille F (2009) Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **101**: 117-131
- Resch A, Afonyushkin T, Lombo TB, McDowall KJ, Blasi U, Kaberdin VR (2008) Translational activation by the noncoding RNA DsrA involves alternative RNase III processing in the rpoS 5'-leader. *RNA (New York, NY)* **14**: 454-459
- Reuven NB, Deutscher MP (1993) Multiple exoribonucleases are required for the 3' processing of Escherichia coli tRNA precursors in vivo. *Faseb J* **7**: 143-148
- Reuven NB, Koonin EV, Rudd KE, Deutscher MP (1995) The gene for the longest known Escherichia coli protein is a member of helicase superfamily II. *Journal of bacteriology* **177**: 5393-5400
- Reynisson J, Schuster GB, Howerton SB, Williams LD, Barnett RN, Cleveland CL, Landman U, Harrit N, Chaires JB (2003) Intercalation of trioxatriangulenium ion in DNA: binding, electron transfer, x-ray crystallography, and electronic structure. *Journal of the American Chemical Society* **125**: 2072-2083
- Riviere C, Subra F, Cohen-Solal K, Cordette-Lagarde V, Letestu R, Auclair C, Vainchenker W, Louache F (1999) Phenotypic and functional evidence for the expression of CXCR4 receptor during megakaryocytopoiesis. *Blood* **93**: 1511-1523
- Roberts JW (1969) Termination factor for RNA synthesis. *Nature* **224**: 1168-1174
- Roberts RB, D.B. Cowie, P.H. Abelson, E. T. Bolton, and R. V. Britten (1955) *Studies of biosynthesis in Escherichia coli*, Washington, D.C.: carnegie Institute of Washington.
- Robertson HD, Dickson E (1984) Structure and distribution of Alu family sequences or their analogs within heterogeneous nuclear RNA of HeLa, KB, and L cells. *Molecular and cellular biology* **4**: 310-316
- Robertson HD, Dunn JJ (1975) Ribonucleic acid processing activity of Escherichia coli ribonuclease III. *The Journal of biological chemistry* **250**: 3050-3056
- Robertson HD, Hunter T (1975) Sensitive methods for the detection and characterization of double helical ribonucleic acid. *The Journal of biological chemistry* **250**: 418-425
- Robertson HD, Webster RE, Zinder ND (1967) A nuclease specific for double-stranded RNA. *Virology* **32**: 718-719
- Romberg L, Levin PA (2003) Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FtsZ: poised at the edge of stability. *Annual review of microbiology* **57**: 125-154

- Rott R, Drager RG, Stern DB, Schuster G (1996) The 3' untranslated regions of chloroplast genes in *Chlamydomonas reinhardtii* do not serve as efficient transcriptional terminators. *Mol Gen Genet* **252**: 676-683
- Rott R, Levy H, Drager RG, Stern DB, Schuster G (1998) 3'-Processed mRNA is preferentially translated in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Molecular and cellular biology* **18**: 4605-4611
- Rott R, Liveanu V, Drager RG, Higgs D, Stern DB, Schuster G (1999) Altering the 3' UTR endonucleolytic cleavage site of a *Chlamydomonas* chloroplast mRNA affects 3'-end maturation in vitro but not in vivo. *Plant molecular biology* **40**: 679-686
- Rott R, Liveanu V, Drager RG, Stern DB, Schuster G (1998) The sequence and structure of the 3'-untranslated regions of chloroplast transcripts are important determinants of mRNA accumulation and stability. *Plant molecular biology* **36**: 307-314
- Rott R, Zipor G, Portnoy V, Liveanu V, Schuster G (2003) RNA polyadenylation and degradation in cyanobacteria are similar to the chloroplast but different from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **278**: 15771-15777
- Rouleau M, Bancroft JB, Mackie GA (1993) Partial purification and characterization of foxtail mosaic potexvirus RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **197**: 695-703
- Roy MK, Apirion D (1983) Purification and properties of ribonuclease E, an RNA-processing enzyme from *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta* **747**: 200-208
- Roy MK, Singh B, Ray BK, Apirion D (1983) Maturation of 5-S rRNA: ribonuclease E cleavages and their dependence on precursor sequences. *European journal of biochemistry / FEBS* **131**: 119-127
- Roy P, Cudny H, Deutscher MP (1982) The transfer RNA processing defect in *Escherichia coli* strains BN and CAN is not due to a mutation in RNAase D or RNAase II. *Journal of molecular biology* **159**: 179-187
- Russel M, Model P (1984) Characterization of the cloned fip gene and its product. *Journal of bacteriology* **157**: 526-532
- Russel M, Model P (1985) Thioredoxin is required for filamentous phage assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 29-33
- Sakai T, Nakamura N, Umitsuki G, Nagai K, Wachi M (2007) Increased production of pyruvic acid by *Escherichia coli* RNase G mutants in combination with *cra* mutations. *Applied microbiology and biotechnology* **76**: 183-192
- Sauter C, Basquin J, Suck D (2003) Sm-like proteins in Eubacteria: the crystal structure of the Hfq protein from *Escherichia coli*. *Nucleic acids research* **31**: 4091-4098
- Schein A, Sheffy-Levin S, Glaser F, Schuster G (2008) The RNase E/G-type endoribonuclease of higher plants is located in the chloroplast and cleaves RNA similarly to the *E. coli* enzyme. *RNA (New York, NY)* **14**: 1057-1068
- Schierling K, Rosch S, Rupprecht R, Schiffer S, Marchfelder A (2002) tRNA 3' end maturation in archaea has eukaryotic features: the RNase Z from *Haloferax volcanii*. *Journal of molecular biology* **316**: 895-902
- Schiffer S, Rosch S, Marchfelder A (2002) Assigning a function to a conserved group of proteins: the tRNA 3'-processing enzymes. *The EMBO journal* **21**: 2769-2777
- Schilling O, Ruggeberg S, Vogel A, Rittner N, Weichert S, Schmidt S, Doig S, Franz T, Benes V, Andrews SC, Baum M, Meyer-Klaucke W (2004) Characterization of an *Escherichia coli* *elaC* deletion mutant. *Biochemical and biophysical research communications* **320**: 1365-1373
- Schilling O, Spath B, Kostecky B, Marchfelder A, Meyer-Klaucke W, Vogel A (2005) Exosite modules guide substrate recognition in the ZIPD/*ElaC* protein family. *The Journal of biological chemistry* **280**: 17857-17862
- Schoenberg DR (2007) The end defines the means in bacterial mRNA decay. *Nature chemical biology* **3**: 535-536

- Schubert M, Edge RE, Lario P, Cook MA, Strynadka NC, Mackie GA, McIntosh LP (2004) Structural characterization of the RNase E S1 domain and identification of its oligonucleotide-binding and dimerization interfaces. *Journal of molecular biology* **341**: 37-54
- Schumacher MA, Pearson RF, Moller T, Valentin-Hansen P, Brennan RG (2002) Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *The EMBO journal* **21**: 3546-3556
- Schuster G, Gruissem W (1991) Chloroplast mRNA 3' end processing requires a nuclear-encoded RNA-binding protein. *The EMBO journal* **10**: 1493-1502
- Schuster G, Horingklee W, Winter H, Esser G, Steinke U, Kochman W, Kramer W, Steinke W (1979) Antiphytoviral activity of 2,4 dioxo hexahydro triazine. *Acta virologica* **23**: 412-420
- Schuster G, Lisitsky I, Klaff P (1999) Polyadenylation and degradation of mRNA in the chloroplast. *Plant physiology* **120**: 937-944
- Schuster G, Ohad I, Martineau B, Taylor WC (1985) Differentiation and development of bundle sheath and mesophyll thylakoids in maize. Thylakoid polypeptide composition, phosphorylation, and organization of photosystem II. *The Journal of biological chemistry* **260**: 11866-11873
- Schuster G, Stern D (2009) RNA polyadenylation and decay in mitochondria and chloroplasts. *Progress in molecular biology and translational science* **85**: 393-422
- Schuster GU, Parini P, Wang L, Alberti S, Steffensen KR, Hansson GK, Angelin B, Gustafsson JA (2002) Accumulation of foam cells in liver X receptor-deficient mice. *Circulation* **106**: 1147-1153
- Schuster-Gossler K, Bilinski P, Sado T, Ferguson-Smith A, Gossler A (1998) The mouse Gtl2 gene is differentially expressed during embryonic development, encodes multiple alternatively spliced transcripts, and may act as an RNA. *Dev Dyn* **212**: 214-228
- Schwedock J, McCormick JR, Angert ER, Nodwell JR, Losick R (1997) Assembly of the cell division protein FtsZ into ladder-like structures in the aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology* **25**: 847-858
- Sekiya T, Contreras R, Takeya T, Khorana HG (1979) Total synthesis of a tyrosine suppressor transfer RNA gene. XVII. Transcription, in vitro, of the synthetic gene and processing of the primary transcript to transfer RNA. *The Journal of biological chemistry* **254**: 5802-5816
- Shan SO, Chandrasekar S, Walter P (2007) Conformational changes in the GTPase modules of the signal reception particle and its receptor drive initiation of protein translocation. *The Journal of cell biology* **178**: 611-620
- Shi Z, Yang WZ, Lin-Chao S, Chak KF, Yuan HS (2008) Crystal structure of *Escherichia coli* PNPase: central channel residues are involved in processive RNA degradation. *RNA (New York, NY)* **14**: 2361-2371
- Shin E, Go H, Yeom JH, Won M, Bae J, Han SH, Han K, Lee Y, Ha NC, Moore CJ, Sohlberg B, Cohen SN, Lee K (2008) Identification of amino acid residues in the catalytic domain of RNase E essential for survival of *Escherichia coli*: functional analysis of DNase I subdomain. *Genetics* **179**: 1871-1879
- Shteiman-Kotler A, Schuster G (2000) RNA-binding characteristics of the chloroplast S1-like ribosomal protein CS1. *Nucleic acids research* **28**: 3310-3315
- Singh B, Apirion D (1982) Primary and secondary structure in a precursor of 5 S rRNA. *Biochimica et biophysica acta* **698**: 252-259
- Sinturel F, Pellegrini O, Xiang S, Tong L, Condon C, Benard L (2009) Real-time fluorescence detection of exoribonucleases. *RNA (New York, NY)* **15**: 2057-2062
- Sledjeski DD, Whitman C, Zhang A (2001) Hfq is necessary for regulation by the untranslated RNA DsrA. *Journal of bacteriology* **183**: 1997-2005

- Slomovic S, Laufer D, Geiger D, Schuster G (2005) Polyadenylation and degradation of human mitochondrial RNA: the prokaryotic past leaves its mark. *Molecular and cellular biology* **25**: 6427-6435
- Slomovic S, Laufer D, Geiger D, Schuster G (2006) Polyadenylation of ribosomal RNA in human cells. *Nucleic acids research* **34**: 2966-2975
- Slomovic S, Portnoy V, Schuster G (2008) Detection and characterization of polyadenylated RNA in Eukarya, Bacteria, Archaea, and organelles. *Methods in enzymology* **447**: 501-520
- Slomovic S, Portnoy V, Yehudai-Resheff S, Bronshtein E, Schuster G (2008) Polynucleotide phosphorylase and the archaeal exosome as poly(A)-polymerases. *Biochimica et biophysica acta* **1779**: 247-255
- Slomovic S, Schuster G (2008) Stable PNPase RNAi silencing: its effect on the processing and adenylation of human mitochondrial RNA. *RNA (New York, NY)* **14**: 310-323
- Smith CW, Patton JG, Nadal-Ginard B (1989) Alternative splicing in the control of gene expression. *Annual review of genetics* **23**: 527-577
- Smith DR, Doucette-Stamm LA, Deloughery C, Lee H, Dubois J, Aldredge T, Bashirzadeh R, Blakely D, Cook R, Gilbert K, Harrison D, Hoang L, Keagle P, Lumm W, Pothier B, Qiu D, Spadafora R, Vicaire R, Wang Y, Wierzbowski J, Gibson R, Jiwani N, Caruso A, Bush D, Reeve JN, et al. (1997) Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *Journal of bacteriology* **179**: 7135-7155
- Smith-Keary P (1989) *Molecular Genetics of Escherichia coli*, First edn. New York: The Guilford Press.
- Snyder HB, Caughman G, Lewis J, Billman MA, Schuster G (2002) Nicotine modulation of in vitro human gingival fibroblast beta1 integrin expression. *Journal of periodontology* **73**: 505-510
- Sohlberg B, Huang J, Cohen SN (2003) The *Streptomyces coelicolor* polynucleotide phosphorylase homologue, and not the putative poly(A) polymerase, can polyadenylate RNA. *Journal of bacteriology* **185**: 7273-7278
- Solari A, Deutscher MP (1983) Identification of multiple RNases in *Xenopus laevis* oocytes and their possible role in tRNA processing. *Molecular and cellular biology* **3**: 1711-1717
- Soreq H, Littauer UZ (1977) Purification and characterization of polynucleotide phosphorylase from *Escherichia coli*. Probe for the analysis of 3' sequences of RNA. *The Journal of biological chemistry* **252**: 6885-6888
- Sousa S, Marchand I, Dreyfus M (2001) Autoregulation allows *Escherichia coli* RNase E to adjust continuously its synthesis to that of its substrates. *Molecular microbiology* **42**: 867-878
- Spickler C, Mackie GA (2000) Action of RNase II and polynucleotide phosphorylase against RNAs containing stem-loops of defined structure. *Journal of bacteriology* **182**: 2422-2427
- Spickler C, Stronge V, Mackie GA (2001) Preferential cleavage of degradative intermediates of rpsT mRNA by the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Journal of bacteriology* **183**: 1106-1109
- Spierer P, Zimmerman RA, Mackie GA (1975) RNA-protein interactions in the ribosome. Binding of 50-S-subunit proteins to 5' and 3' terminal segments of the 23-S RNA. *European journal of biochemistry / FEBS* **52**: 459-468
- Squires CL, Condon C, Seoh HK (2003) Assay of antitermination of ribosomal RNA transcription. *Methods in enzymology* **371**: 472-487
- Squires CL, Greenblatt J, Li J, Condon C, Squires CL (1993) Ribosomal RNA antitermination in vitro: requirement for Nus factors and one or more unidentified cellular components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 970-974

- Srinivasan PR, Ramanarayanan M, Rabbani E (1975) Presence of polyriboadenylate sequences in pulse-labeled RNA of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**: 2910-2914
- Srivastava RA, Srivastava N, Apirion D (1991) RNA processing enzymes RNase III, E and P in *Escherichia coli* are not ribosomal enzymes. *Biochemistry international* **25**: 57-65
- Srivastava RA, Srivastava N, Apirion D (1992) Characterization of the RNA processing enzyme RNase III from wild type and overexpressing *Escherichia coli* cells in processing natural RNA substrates. *The International journal of biochemistry* **24**: 737-749
- Srivastava RK, Miczak A, Apirion D (1990) Maturation of precursor 10Sa RNA in *Escherichia coli* is a two-step process: the first reaction is catalyzed by RNase III in presence of Mn²⁺. *Biochimie* **72**: 791-802
- Stark BC, Kole R, Bowman EJ, Altman S (1978) Ribonuclease P: an enzyme with an essential RNA component. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**: 3717-3721
- Steffensen KR, Schuster GU, Parini P, Holter E, Sadek CM, Cassel T, Eskild W, Gustafsson JA (2002) Different regulation of the LX α promoter activity by isoforms of CCAAT/enhancer-binding proteins. *Biochemical and biophysical research communications* **293**: 1333-1340
- Steitz JA, Jakes K (1975) How ribosomes select initiator regions in mRNA: base pair formation between the 3' terminus of 16S rRNA and the mRNA during initiation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**: 4734-4738
- Stenz E, Menzel G, Schuster G (1980) [Effect of traizoles on DNA- and RNA-containing bacteriophages and their hosts]. *Mikrobiologicheskii zhurnal* **42**: 239-242
- Stern MJ, Ames GF, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF (1984) Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* **37**: 1015-1026
- Stevens A (1960) Incorporation of the adenine ribonucleotide into RNA by cell fractions from *E. coli* B. *Biochemical and biophysical research communications* **3**: 92-96
- Stickney LM, Hankins JS, Miao X, Mackie GA (2005) Function of the conserved S1 and KH domains in polynucleotide phosphorylase. *Journal of bacteriology* **187**: 7214-7221
- Storz G, Opdyke JA, Zhang A (2004) Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Current opinion in microbiology* **7**: 140-144
- Stulnig TM, Oppermann U, Steffensen KR, Schuster GU, Gustafsson JA (2002) Liver X receptors downregulate 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and activity. *Diabetes* **51**: 2426-2433
- Subbarao MN, Apirion D (1989) A precursor for a small stable RNA (10Sa RNA) of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **217**: 499-504
- Subbarao MN, Makam H, Apirion D (1984) A site in a tRNA precursor that can be processed by the whole RNase P enzyme but not by the RNA alone. *The Journal of biological chemistry* **259**: 14339-14342
- Subbarayan PR, Deutscher MP (2001) *Escherichia coli* RNase M is a multiply altered form of RNase I. *RNA (New York, NY)* **7**: 1702-1707
- Suzuki H, Nishimura Y, Yasuda S, Nishimura A, Yamada M, Hirota Y (1978) Murein-lipoprotein of *Escherichia coli*: a protein involved in the stabilization of bacterial cell envelope. *Mol Gen Genet* **167**: 1-9
- Suzuki K, Babitzke P, Kushner SR, Romeo T (2006) Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E. *Genes & development* **20**: 2605-2617
- Symmons MF, Jones GH, Luisi BF (2000) A duplicated fold is the structural basis for polynucleotide phosphorylase catalytic activity, processivity, and regulation. *Structure* **8**: 1215-1226

- Symmons MF, Williams MG, Luisi BF, Jones GH, Carpousis AJ (2002) Running rings around RNA: a superfamily of phosphate-dependent RNases. *Trends in biochemical sciences* **27**: 11-18
- Szeberenyi J, Apirion D (1983) Initiation, processing and termination of ribosomal RNA from a hybrid 5 S ribosomal RNA gene in a plasmid. *Journal of molecular biology* **168**: 525-557
- Szeberenyi J, Apirion D (1984) Synthesis and processing of 5 S rRNA from an rrnB minigene in a plasmid. *Biochimica et biophysica acta* **783**: 15-25
- Szeberenyi J, Roy MK, Apirion D (1983) Precursor nucleotides at the 5' end are not required for processing by RNase E at the 3' end of 5-S rRNA. *European journal of biochemistry / FEBS* **136**: 321-326
- Szeberenyi J, Roy MK, Vaidya HC, Apirion D (1984) 7S RNA, containing 5S ribosomal RNA and the termination stem, is a specific substrate for the two RNA processing enzymes RNase III and RNase E. *Biochemistry* **23**: 2952-2957
- Taghbalout A, Rothfield L (2007) RNaseE and the other constituents of the RNA degradosome are components of the bacterial cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 1667-1672
- Taghbalout A, Rothfield L (2008) New insights into the cellular organization of the RNA processing and degradation machinery of Escherichia coli. *Molecular microbiology* **70**: 780-782
- Taghbalout A, Rothfield L (2008) RNaseE and RNA helicase B play central roles in the cytoskeletal organization of the RNA degradosome. *The Journal of biological chemistry* **283**: 13850-13855
- Takada A, Nagai K, Wachi M (2005) A decreased level of FtsZ is responsible for inviability of RNase E-deficient cells. *Genes Cells* **10**: 733-741
- Takada A, Umitsuki G, Nagai K, Wachi M (2007) RNase E is required for induction of the glutamate-dependent acid resistance system in Escherichia coli. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **71**: 158-164
- Takata R, Mukai T, Hori K (1985) Attenuation and processing of RNA from the rpsO-pnp transcription unit of Escherichia coli. *Nucleic acids research* **13**: 7289-7297
- Takata R, Mukai T, Hori K (1987) RNA processing by RNase III is involved in the synthesis of Escherichia coli polynucleotide phosphorylase. *Mol Gen Genet* **209**: 28-32
- Takiff HE, Chen SM, Court DL (1989) Genetic analysis of the rnc operon of Escherichia coli. *Journal of bacteriology* **171**: 2581-2590
- Tal J, Deutscher MP, Littauer UZ (1972) Biological activity of Escherichia coli tRNA Phe modified in its C-C-A terminus. *European journal of biochemistry / FEBS* **28**: 478-491
- Tamura M, Lee K, Miller CA, Moore CJ, Shirako Y, Kobayashi M, Cohen SN (2006) RNase E maintenance of proper FtsZ/FtsA ratio required for nonfilamentous growth of Escherichia coli cells but not for colony-forming ability. *Journal of bacteriology* **188**: 5145-5152
- Taraseviciene L, Bjork GR, Uhlin BE (1995) Evidence for an RNA binding region in the Escherichia coli processing endoribonuclease RNase E. *The Journal of biological chemistry* **270**: 26391-26398
- Taraseviciene L, Miczak A, Apirion D (1991) The gene specifying RNase E (rne) and a gene affecting mRNA stability (ams) are the same gene. *Molecular microbiology* **5**: 851-855
- Taraseviciene L, Naureckiene S, Uhlin BE (1994) Immunoaffinity purification of the Escherichia coli rne gene product. Evidence that the rne gene encodes the processing endoribonuclease RNase E. *The Journal of biological chemistry* **269**: 12167-12172
- Tatum EL, Lederberg J (1947) Gene recombination in the bacterium Escherichia coli. *Journal of bacteriology* **53**: 673-684

Tatusov RL, Galperin MY, Natale DA, Koonin EV (2000) The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic acids research* **28**: 33-36

Tavtigian SV, Simard J, Teng DH, Abtin V, Baumgard M, Beck A, Camp NJ, Carillo AR, Chen Y, Dayananth P, Desrochers M, Dumont M, Farnham JM, Frank D, Frye C, Ghaffari S, Gupte JS, Hu R, Iliev D, Janecki T, Kort EN, Laity KE, Leavitt A, Leblanc G, McArthur-Morrison J, Pederson A, Penn B, Peterson KT, Reid JE, Richards S, Schroeder M, Smith R, Snyder SC, Swedlund B, Swensen J, Thomas A, Tranchant M, Woodland AM, Labrie F, Skolnick MH, Neuhausen S, Rommens J, Cannon-Albright LA (2001) A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. *Nature genetics* **27**: 172-180

Tetart F, Albigot R, Conter A, Mulder E, Bouche JP (1992) Involvement of FtsZ in coupling of nucleoid separation with septation. *Molecular microbiology* **6**: 621-627

Theimer CA, Wang Y, Hoffman DW, Krisch HM, Giedroc DP (1998) Non-nearest neighbor effects on the thermodynamics of unfolding of a model mRNA pseudoknot. *Journal of molecular biology* **279**: 545-564

Tobin KA, Ulven SM, Schuster GU, Steineger HH, Andresen SM, Gustafsson JA, Nebb HI (2002) Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* **277**: 10691-10697

Tock MR, Walsh AP, Carroll G, McDowall KJ (2000) The CafA protein required for the 5'-maturation of 16 S rRNA is a 5'-end-dependent ribonuclease that has context-dependent broad sequence specificity. *The Journal of biological chemistry* **275**: 8726-8732

Todeschini AL, Condon C, Benard L (2006) Sodium-induced GCN4 expression controls the accumulation of the 5' to 3' RNA degradation inhibitor, 3'-phosphoadenosine 5'-phosphate. *The Journal of biological chemistry* **281**: 3276-3282

Tomcsanyi T, Apirion D (1985) Processing enzyme ribonuclease E specifically cleaves RNA I. An inhibitor of primer formation in plasmid DNA synthesis. *Journal of molecular biology* **185**: 713-720

Tomizawa J, Masukata H (1987) Factor-independent termination of transcription in a stretch of deoxyadenosine residues in the template DNA. *Cell* **51**: 623-630

Torres M, Condon C, Balada JM, Squires C, Squires CL (2001) Ribosomal protein S4 is a transcription factor with properties remarkably similar to NusA, a protein involved in both non-ribosomal and ribosomal RNA antitermination. *The EMBO journal* **20**: 3811-3820

Travers AA, Burgessrr (1969) Cyclic re-use of the RNA polymerase sigma factor. *Nature* **222**: 537-540

Trinkle-Mulcahy L, Ajuh P, Prescott A, Claverie-Martin F, Cohen S, Lamond AI, Cohen P (1999) Nuclear organisation of NIPP1, a regulatory subunit of protein phosphatase 1 that associates with pre-mRNA splicing factors. *Journal of cell science* **112 (Pt 2)**: 157-168

Tsang ML, Schiff JA (1976) Sulfate-reducing pathway in Escherichia coli involving bound intermediates. *Journal of bacteriology* **125**: 923-933

Tucker BJ, Breaker RR (2005) Riboswitches as versatile gene control elements. *Current opinion in structural biology* **15**: 342-348

Umitsuki G, Wachi M, Takada A, Hikichi T, Nagai K (2001) Involvement of RNase G in in vivo mRNA metabolism in Escherichia coli. *Genes Cells* **6**: 403-410

Unniraman S, Prakash R, Nagaraja V (2002) Conserved economics of transcription termination in eubacteria. *Nucleic acids research* **30**: 675-684

Uppal S, Akkipeddi VS, Jawali N (2008) Posttranscriptional regulation of cspE in Escherichia coli: involvement of the short 5'-untranslated region. *FEMS microbiology letters* **279**: 83-91

- Van Eynde A, Wera S, Beullens M, Torrekens S, Van Leuven F, Stalmans W, Bollen M (1995) Molecular cloning of NIPP-1, a nuclear inhibitor of protein phosphatase-1, reveals homology with polypeptides involved in RNA processing. *The Journal of biological chemistry* **270**: 28068-28074
- van Hoof A, Lennertz P, Parker R (2000) Yeast exosome mutants accumulate 3'-extended polyadenylated forms of U4 small nuclear RNA and small nucleolar RNAs. *Molecular and cellular biology* **20**: 441-452
- Vanderpool CK, Gottesman S (2004) Involvement of a novel transcriptional activator and small RNA in post-transcriptional regulation of the glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *Molecular microbiology* **54**: 1076-1089
- Vanzo NF, Li YS, Py B, Blum E, Higgins CF, Raynal LC, Krisch HM, Carpousis AJ (1998) Ribonuclease E organizes the protein interactions in the Escherichia coli RNA degradosome. *Genes & development* **12**: 2770-2781
- Vincent HA, Deutscher MP (2006) Substrate recognition and catalysis by the exoribonuclease RNase R. *The Journal of biological chemistry* **281**: 29769-29775
- Vincent HA, Deutscher MP (2009) The roles of individual domains of RNase R in substrate binding and exoribonuclease activity. The nuclease domain is sufficient for digestion of structured RNA. *The Journal of biological chemistry* **284**: 486-494
- Vogel A, Schilling O, Niecke M, Bettmer J, Meyer-Klaucke W (2002) ElaC encodes a novel binuclear zinc phosphodiesterase. *The Journal of biological chemistry* **277**: 29078-29085
- Vogel J, Sharma CM (2005) How to find small non-coding RNAs in bacteria. *Biological chemistry* **386**: 1219-1238
- Vogel J, Wagner EG (2007) Target identification of small noncoding RNAs in bacteria. *Current opinion in microbiology* **10**: 262-270
- von Ahsen U, Noller HF (1995) Identification of bases in 16S rRNA essential for tRNA binding at the 30S ribosomal P site. *Science (New York, NY)* **267**: 234-237
- Vytvytska O, Moll I, Kaberdin VR, von Gabain A, Blasi U (2000) Hfq (HF1) stimulates ompA mRNA decay by interfering with ribosome binding. *Genes & development* **14**: 1109-1118
- Wachi M, Kaga N, Umitsuki G, Clark DP, Nagai K (2001) A novel RNase G mutant that is defective in degradation of adhE mRNA but proficient in the processing of 16S rRNA precursor. *Biochemical and biophysical research communications* **289**: 1301-1306
- Wachi M, Nagai K (2001) Escherichia coli ribonuclease G. *Methods in enzymology* **342**: 55-63
- Wachi M, Umitsuki G, Nagai K (1997) Functional relationship between Escherichia coli RNase E and the CafA protein. *Mol Gen Genet* **253**: 515-519
- Wachi M, Umitsuki G, Shimizu M, Takada A, Nagai K (1999) Escherichia coli cafA gene encodes a novel RNase, designated as RNase G, involved in processing of the 5' end of 16S rRNA. *Biochemical and biophysical research communications* **259**: 483-488
- Wagner EG, Altuvia S, Romby P (2002) Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements. *Advances in genetics* **46**: 361-398
- Wagner R (2000) *Transcription Regulation in Prokaryotes*: Oxford University Press, Oxford,.
- Wakamiya M, Matsuura T, Liu Y, Schuster GC, Gao R, Xu W, Sarkar PS, Lin X, Ashizawa T (2006) The role of ataxin 10 in the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 10. *Neurology* **67**: 607-613
- Walsh AP, Tock MR, Mallen MH, Kaberdin VR, von Gabain A, McDowall KJ (2001) Cleavage of poly(A) tails on the 3'-end of RNA by ribonuclease E of Escherichia coli. *Nucleic acids research* **29**: 1864-1871
- Wang L, Schuster GU, Hultenby K, Zhang Q, Andersson S, Gustafsson JA (2002) Liver X receptors in the central nervous system: from lipid homeostasis to neuronal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 13878-13883

- Wang M, Cohen SN (1994) *ard-1*: a human gene that reverses the effects of temperature-sensitive and deletion mutations in the *Escherichia coli* *rne* gene and encodes an activity producing RNase E-like cleavages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 10591-10595
- Wassarman KM (2002) Small RNAs in bacteria: diverse regulators of gene expression in response to environmental changes. *Cell* **109**: 141-144
- Watson N, Apirion D (1981) Ribonuclease F, a putative processing endoribonuclease from *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications* **103**: 543-551
- Watson N, Apirion D (1985) Molecular cloning of the gene for the RNA-processing enzyme RNase III of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 849-853
- Watson N, Gurevitz M, Ford J, Apirion D (1984) Self cleavage of a precursor RNA from bacteriophage T4. *Journal of molecular biology* **172**: 301-323
- Wegscheid B, Condon C, Hartmann RK (2006) Type A and B RNase P RNAs are interchangeable in vivo despite substantial biophysical differences. *EMBO reports* **7**: 411-417
- Wei XY, Perez-Reyes E, Lacerda AE, Schuster G, Brown AM, Birnbaumer L (1991) Heterologous regulation of the cardiac Ca²⁺ channel α 1 subunit by skeletal muscle β and γ subunits. Implications for the structure of cardiac L-type Ca²⁺ channels. *The Journal of biological chemistry* **266**: 21943-21947
- Weiss SBA, L. (1959) A mammalian system for the incorporation of cytidine triphosphate into ribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* **81**: 4118
- Wen T, Oussenko IA, Pellegrini O, Bechhofer DH, Condon C (2005) Ribonuclease PH plays a major role in the exonucleolytic maturation of CCA-containing tRNA precursors in *Bacillus subtilis*. *Nucleic acids research* **33**: 3636-3643
- Winkler WC (2005) Riboswitches and the role of noncoding RNAs in bacterial metabolic control. *Current opinion in chemical biology* **9**: 594-602
- Wollman EaW, E (1936) Recherches sur le phenomene de Twort-d'Herelle Bacteriophagie ou autolyse h r do-contagieuse. *Ann inst Pasteur* **56**: 137-164
- Worrall JA, Howe FS, McKay AR, Robinson CV, Luisi BF (2008) Allosteric activation of the ATPase activity of the *Escherichia coli* RhIB RNA helicase. *The Journal of biological chemistry* **283**: 5567-5576
- Wu L, Belasco JG (2008) Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Molecular cell* **29**: 1-7
- Xu F, Cohen SN (1995) RNA degradation in *Escherichia coli* regulated by 3' adenylation and 5' phosphorylation. *Nature* **374**: 180-183
- Xu F, Lin-Chao S, Cohen SN (1993) The *Escherichia coli* *pcnB* gene promotes adenylation of antisense RNAI of ColE1-type plasmids in vivo and degradation of RNAI decay intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 6756-6760
- Xu W, Huang J, Cohen SN (2008) Autoregulation of AbsB (RNase III) expression in *Streptomyces coelicolor* by endoribonucleolytic cleavage of *absB* operon transcripts. *Journal of bacteriology* **190**: 5526-5530
- Yang J, Schuster G, Stern DB (1996) CSP41, a sequence-specific chloroplast mRNA binding protein, is an endoribonuclease. *The Plant cell* **8**: 1409-1420
- Yarchuk O, Iost I, Dreyfus M (1991) The relation between translation and mRNA degradation in the *lacZ* gene. *Biochimie* **73**: 1533-1541

- Yarchuk O, Jacques N, Guillerez J, Dreyfus M (1992) Interdependence of translation, transcription and mRNA degradation in the lacZ gene. *Journal of molecular biology* **226**: 581-596
- Yehudai-Resheff S, Hirsh M, Schuster G (2001) Polynucleotide phosphorylase functions as both an exonuclease and a poly(A) polymerase in spinach chloroplasts. *Molecular and cellular biology* **21**: 5408-5416
- Yehudai-Resheff S, Portnoy V, Yogev S, Adir N, Schuster G (2003) Domain analysis of the chloroplast polynucleotide phosphorylase reveals discrete functions in RNA degradation, polyadenylation, and sequence homology with exosome proteins. *The Plant cell* **15**: 2003-2019
- Yehudai-Resheff S, Schuster G (2000) Characterization of the E.coli poly(A) polymerase: nucleotide specificity, RNA-binding affinities and RNA structure dependence. *Nucleic acids research* **28**: 1139-1144
- Young RA, Steitz JA (1978) Complementary sequences 1700 nucleotides apart form a ribonuclease III cleavage site in Escherichia coli ribosomal precursor RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**: 3593-3597
- Yu D, Deutscher MP (1995) Oligoribonuclease is distinct from the other known exoribonucleases of Escherichia coli. *Journal of bacteriology* **177**: 4137-4139
- Yuan Y, Altman S (1995) Substrate recognition by human RNase P: identification of small, model substrates for the enzyme. *The EMBO journal* **14**: 159-168
- Yue WY, Cohen SS (1967) Sputum induction by newer inhalation methods in patients with pulmonary tuberculosis. *Diseases of the chest* **51**: 614-620
- Zaniewski R, Deutscher MP (1982) Genetic mapping of mutation in Escherichia coli leading to a temperature-sensitive RNase D. *Mol Gen Genet* **185**: 142-147
- Zaniewski R, Petkaitis E, Deutscher MP (1984) A multiple mutant of Escherichia coli lacking the exoribonucleases RNase II, RNase D, and RNase BN. *The Journal of biological chemistry* **259**: 11651-11653
- Zeller ME, Csanadi A, Miczak A, Rose T, Bizebard T, Kaberdin VR (2007) Quaternary structure and biochemical properties of mycobacterial RNase E/G. *The Biochemical journal* **403**: 207-215
- Zhang A, Altuvia S, Tiwari A, Argaman L, Hengge-Aronis R, Storz G (1998) The OxyS regulatory RNA represses rpoS translation and binds the Hfq (HF-I) protein. *The EMBO journal* **17**: 6061-6068
- Zhang A, Wassarman KM, Ortega J, Steven AC, Storz G (2002) The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Molecular cell* **9**: 11-22
- Zhang A, Wassarman KM, Rosenow C, Tjaden BC, Storz G, Gottesman S (2003) Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. *Molecular microbiology* **50**: 1111-1124
- Zhang J, Deutscher MP (1992) A uridine-rich sequence required for translation of prokaryotic mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 2605-2609
- Zhang JR, Deutscher MP (1988) Cloning, characterization, and effects of overexpression of the Escherichia coli rnd gene encoding RNase D. *Journal of bacteriology* **170**: 522-527
- Zhang JR, Deutscher MP (1988) Escherichia coli RNase D: sequencing of the rnd structural gene and purification of the overexpressed protein. *Nucleic acids research* **16**: 6265-6278
- Zhang JR, Deutscher MP (1988) Transfer RNA is a substrate for RNase D in vivo. *The Journal of biological chemistry* **263**: 17909-17912
- Zhang JR, Deutscher MP (1989) Analysis of the upstream region of the Escherichia coli rnd gene encoding RNase D. Evidence for translational regulation of a putative tRNA processing enzyme. *The Journal of biological chemistry* **264**: 18228-18233

- Zhang M, Pierce RA, Wachi H, Mecham RP, Parks WC (1999) An open reading frame element mediates posttranscriptional regulation of tropoelastin and responsiveness to transforming growth factor beta1. *Molecular and cellular biology* **19**: 7314-7326
- Zhang X, Zhu L, Deutscher MP (1998) Oligoribonuclease is encoded by a highly conserved gene in the 3'-5' exonuclease superfamily. *Journal of bacteriology* **180**: 2779-2781
- Zhang Y, Zhang J, Hara H, Kato I, Inouye M (2005) Insights into the mRNA cleavage mechanism by MazF, an mRNA interferase. *The Journal of biological chemistry* **280**: 3143-3150
- Zhang Y, Zhang J, Hoeflich KP, Ikura M, Qing G, Inouye M (2003) MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in Escherichia coli. *Molecular cell* **12**: 913-923
- Zhang Y, Zhu L, Zhang J, Inouye M (2005) Characterization of ChpBK, an mRNA interferase from Escherichia coli. *The Journal of biological chemistry* **280**: 26080-26088
- Zhou Z, Deutscher MP (1997) An essential function for the phosphate-dependent exoribonucleases RNase PH and polynucleotide phosphorylase. *Journal of bacteriology* **179**: 4391-4395
- Zhu L, Deutscher MP (1987) tRNA nucleotidyltransferase is not essential for Escherichia coli viability. *The EMBO journal* **6**: 2473-2477
- Zhu L, Deutscher MP (1992) The Escherichia coli rna gene encoding RNase I: sequence and unusual promoter structure. *Gene* **119**: 101-106
- Zhu L, Inoue K, Yoshizumi S, Kobayashi H, Zhang Y, Ouyang M, Kato F, Sugai M, Inouye M (2009) Staphylococcus aureus MazF specifically cleaves a pentad sequence, UACAU, which is unusually abundant in the mRNA for pathogenic adhesive factor SraP. *Journal of bacteriology* **191**: 3248-3255
- Zhu LQ, Gangopadhyay T, Padmanabha KP, Deutscher MP (1990) Escherichia coli rna gene encoding RNase I: cloning, overexpression, subcellular distribution of the enzyme, and use of an rna deletion to identify additional RNases. *Journal of bacteriology* **172**: 3146-3151
- Zimmer SL, Schein A, Zipor G, Stern DB, Schuster G (2009) Polyadenylation in Arabidopsis and Chlamydomonas organelles: the input of nucleotidyltransferases, poly(A) polymerases and polynucleotide phosphorylase. *Plant J*
- Zimmermann RA, Mackie GA, Muto A, Garrett RA, Ungewickell E, Ehresmann C, Stiegler P, Ebel JP, Fellner P (1975) Location and characteristics of ribosomal protein binding sites in the 16S RNA of Escherichia coli. *Nucleic acids research* **2**: 279-302
- Zimmermann RA, Muto A, Mackie GA (1974) RNA-protein interactions in the ribosome. II. Binding of ribosomal proteins to isolated fragments of the 16S RNA. *Journal of molecular biology* **86**: 433-450
- Zinder ND, Lederberg J (1952) Genetic exchange in Salmonella. *Journal of bacteriology* **64**: 679-699
- Zuo Y, Deutscher MP (1999) The DNase activity of RNase T and its application to DNA cloning. *Nucleic acids research* **27**: 4077-4082
- Zuo Y, Deutscher MP (2001) Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic acids research* **29**: 1017-1026
- Zuo Y, Deutscher MP (2002) Mechanism of action of RNase T. I. Identification of residues required for catalysis, substrate binding, and dimerization. *The Journal of biological chemistry* **277**: 50155-50159
- Zuo Y, Deutscher MP (2002) Mechanism of action of RNase T. II. A structural and functional model of the enzyme. *The Journal of biological chemistry* **277**: 50160-50164

Zuo Y, Deutscher MP (2002) The physiological role of RNase T can be explained by its unusual substrate specificity. *The Journal of biological chemistry* **277**: 29654-29661

Zuo Y, Vincent HA, Zhang J, Wang Y, Deutscher MP, Malhotra A (2006) Structural basis for processivity and single-strand specificity of RNase II. *Molecular cell* **24**: 149-156